UNTERSUCHUNGEN ZUR POLYMORPHIE VON DIGOXIGENIN UND ZUM EINFLUSS VON KOLLOIDEN UND TENSIDEN AUF DEN VERTEILUNGSZUSTAND IN FESTEN ZUBEREITUNGEN

vorgelegt von

Hans-Ulrich Heller

aus Nürnberg

1986 № 415

UNTERSUCHUNGEN ZUR POLYMORPHIE VON DIGOXIGENIN UND ZUM EINFLUSS VON KOLLOIDEN UND TENSIDEN AUF DEN VERTEILUNGSZUSTAND IN FESTEN ZUBEREITUNGEN

Den Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Friedrich - Alexander - Universität Erlangen Nürnberg
zur
Erlangung des Doktorgrades

vorgelegt von
Hans-Ulrich Heller
aus Nürnberg

Als Dissertation genehmigt von den

Naturwissenschaftlichen Fakultäten der Universität

Erlangen-Nürnberg

Tag der mündlichen Prüfung: 21. Juli 1986

Vorsitzender der
Promotionskommission : Professor Dr. K. Brodersen

Erstberichterstatter : Professor Dr. E. Nürnberg

Zweitberichterstatter : Professor Dr. H. Achenbach

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom Juni 1981 bis Juni 1986 am Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie, Lehrstuhl für Pharmazeutische Technologie, der Universität Erlangen-Nürnberg angefertigt.

Meinem geschätzten akademischen Lehrer, Herrn Professor Dr. E. Nürnberg, danke ich für die Themenstellung und die Anregungen und Diskussionen zur Durchführung der Arbeit.

Allen Mitarbeitern des Lehrstuhls gilt mein Dank für vielfältige Diskussionsbeiträge und die prompte Hilfestellung bei allen anstehenden Fragen. Besonders Herrn Dr. Schenk möchte ich für wertvolle Hinweise am Ende meiner Arbeit danken. Ihm sowie Herrn Oechslein gilt auch mein Dank für die Entwicklung von Rechnerprogrammen. Herrn Drechsler danke ich für die Ausführung mechanischer und feinmechanischer Arbeiten aller Art und Frl. Schedl für zahlreiche photographische Arbeiten. Frau Gast möchte ich für ihre freundliche Hilfsbereitschaft und die gewissenhafte Durchführung von Schreibarbeiten danken.

Innerhalb der Universität danke ich Herrn Professor Dr. Fischer vom Institut für Physiologische Chemie für interessante Anregungen zu dieser Arbeit. Frau Beuerlein und Frau Lüling gilt mein Dank für die Anfertigung von IR-Aufnahmen und Herrn Dr. Hahn und Herrn Gillich für die Unterstützung bei den Problemen, die die HPLC betrafen. Den Mitarbeitern des Zoologischen Instituts danke ich für die Benutzungsmöglichkeit des Rasterelektronenmikroskops.

Ferner danke ich Herrn Dr. Loebich, Firma E. Merck in Darmstadt, für die Überlassung von Herzglykosidmustern und der Firma Nattermann Chemie GmbH in Köln für die Bereitstellung von hochgereinigten Sojaphosphatiden. Frau Griffith vom Institut für Organische Chemie der Universität Mainz gilt mein Dank für die Durchführung von DSC-Messungen.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Handelsnamen und Warenbezeichnungen berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zur Annahme, daß solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Warenschutzgesetzgebung als frei zu betrachten wären.

Nach dem Gesetz über die Einheiten im Meßwesen vom 2.7.1969, geändert am 6.7.1973, ist die offizielle Einheit für Temperaturangaben Kelvin (K). Zum besseren Verständnis sind die Werte der Celsiusskala in ^{o}C beigefügt.

Otti und Sonja

für die entgangene gemeinsame Zeit

τῆς δ' ἀρετῆς ἱδρῶτα θεοὶ προπάροιθεν ἔθηκαν
ἀθάνατοι

(Hesiod, Werke und Tage, 289)

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

		Seite
1.	Einleitung	1
1.1.	Thematische Voraussetzungen der vorliegenden Arbeit	1
1.1.1.	Parakristallinität und Polymorphie bei Digoxin und dessen Genin	1
1.1.2.	Biopharmazeutische Aspekte des Digoxigenins	3
1.1.3.	Sprüheinbettungen unter Einsatz von Phospholipiden	7
1.2.	Zielsetzung	10
2.	Der Wirkstoff	11
2.1.	Chemie des Digoxigenins	11
2.2.	Pharmazeutisch relevante Eigenschaften in der Literatur	14
2.3.	Weitere experimentell ermittelte Eigenschaften	14
2.4.	Deutungsvorschläge für die unterschiedlichen thermischen Eigenschaften	19
2.5.	Reinheitsuntersuchungen	20
2.5.1.	Reinheitsuntersuchungen mittels Dünnschichtchromatographie (DC)	21
2.5.2.	Reinheitsuntersuchungen mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)	23
3.	Das wasserhaltige Digoxigenin	26
3.1.	Ausfällung in Wasser	26
3.2.	Anwendung verschiedener thermoanalytischer Untersuchungsverfahren	27
3.2.1.	Differentialthermoanalyse und Thermogravimetrie	27
3.2.2.	Allgemeine Bemerkungen zur Röntgendiffraktometrie	28
3.2.3.	Röntgendiffraktometrie bei steigenden Temperaturen	30
3.2.4.	Polarisationsmikroskopie	36
3.2.5.	Gegenüberstellung der bisherigen Versuchsergebnisse	41

3.3.	Untersuchung des Einflusses definierter Umgebungsfeuchtigkeit	42
3.3.1.	Lagerung über Schwefelsäure	42
3.3.2.	Erstellung einer Sorptionsisothermen	44
3.4.	Untersuchungen unter isothermen Bedingungen	46
3.4.1.	Thermogravimetrie	46
3.4.2.	Röntgendiffraktometrie	48
3.5.	IR-Untersuchungen des wasserfreien und des wasserhaltigen Digoxigenins	50
3.6.	Wertung der Ergebnisse und Schlußbetrachtung	53
4.	Das amorphe Digoxigenin	56
4.1.	Amorphisierung durch Sprühtrocknung	56
4.1.1.	Allgemeine Bemerkungen zur Sprühtrocknung	56
4.1.2.	Sprühtrocknung von Digoxigenin	58
4.1.3.	Untersuchung der Sprühtrocknungsprodukte	60
4.1.4.	Untersuchung der gelagerten Sprühprodukte mittels Röntgendiffraktometrie	64
4.1.5.	DTA-Untersuchungen von gelagertem sprühgetrocknetem Digoxigenin	66
4.1.6.	Untersuchung der gelagerten Digoxigenin-Sprühprodukte mittels Polarisationsheizmikroskopie	69
4.2.	Amorphisierung im Rotationsverdampfer	73
4.2.1.	Rotationsverdampfung aus ethanolischer Lösung	74
4.2.2.	Einfluß des Ethanolgehalts auf den Amorphitätsgrad	76
4.2.3.	Rotationsverdampfung acetonischer Digoxigeninlösungen	78
4.2.4.	Temperversuch	81
4.3.	Amorphisierung durch Mahlung	82
4.3.1.	Mahlversuche in einer Mikroschnellmühle	82
4.3.2.	DTA-Untersuchungen der Mahlprodukte	84
4.3.3.	Bestimmung des Wassergehalts	86
4.3.4.	Untersuchungen und Überlegungen zum Kristallinitätsgrad	88
4.3.5.	Lagerung der Mahlprodukte	92

4.4.	Tribomechanische Behandlung von sprühgetrocknetem Digoxigenin	94
4.4.1.	Bemerkungen zum tribomechanischen Gleichgewicht	94
4.4.2.	Untersuchung des gemahlenen Sprühtrocknungsproduktes	95
4.5.	Inhibierung der Rekristallisation amorpher Produkte	98
4.5.1.	Einbettung in makromolekulare Hilfsstoffe	98
4.5.2.	Untersuchung der erhaltenen Einbettungen	100
4.6.	Zusammenfassung	101
5.	Das polymorphe Digoxigenin	103
5.1.	Allgemeines zur Polymorphie	103
5.2.	Herstellung polymorpher Formen	104
5.2.1.	Kristallisation aus apolaren Lösungsmitteln	105
5.2.2.	Kristallisation aus Methanol, Ethanol und Aceton	107
5.2.3.	Kristallisation aus Acetonitril und Dimethylformamid	107
5.2.4.	Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Kristallisationsversuchen	109
5.3.	Untersuchungen zum Auflösungsverhalten	110
5.3.1.	Theoretische Bedeutung der Sättigungslöslichkeit	111
5.3.2.	Bestimmung der Sättigungslöslichkeit	112
5.3.3.	Bemerkungen zur Theorie der Auflösungsgeschwindigkeit	115
5.3.4.	Bestimmung der Auflösungsgeschwindigkeit (Intrinsic Dissolution Rate)	116
5.3.5.	Zusammenfassung der Ergebnisse	120
5.4.	IR-Untersuchungen	121
5.5.	Bestimmung der Schmelzenthalpie mittels DSC	122
5.6.	Thermodynamische Aspekte der Polymorphie	125
5.6.1.	Theorie der Enantiotropie	125
5.6.2.	Variation der Aufheizgeschwindigkeit in der DTA	126
5.6.3.	DTA-Untersuchungen von Modifikationsmischungen	129
5.6.4.	Enantiotrope Umwandlung der Modifikation I	132
5.6.5.	Bestimmung des Umwandlungspunktes	134
5.6.6.	Bestimmung der Umwandlungsenthalpie	137

5.7.	Zusammenfassung der Ergebnisse und Schlußbetrachtung	138
6.	Digoxigenin in Liposomen	141
6.1.	Grundlagen der Liposomenentstehung	142
6.1.1.	Phospholipide als Strukturträger	142
6.1.2.	Die Sojaphosphatide NC 95 und NC 95 H	145
6.1.3.	Bestimmung der Phasenübergangstemperatur	149
6.1.4.	Bedeutung der Phasenübergangstemperatur	153
6.1.5.	Einfluß von Cholesterol	154
6.1.6.	Herstellung von digoxigeninhaltigen Liposomen	157
6.1.7.	Bestimmung des Digoxigeningehaltes	159
6.2.	Gewinnung von Liposomensprüheinbettungen	161
6.2.1.	Problematik der Stabilität von Liposomen	161
6.2.2.	Sprühtrocknung als Methode zur Stabilitätserhöhung	163
6.2.3.	Liposomen in Sprüheinbettungen	165
6.2.4.	Eigenschaften der Liposomen-MC E5-Einbettungen (1 : 4)	166
6.2.5.	Verhalten der Liposomen-MC E5-Einbettungen bei der Dispergierung in Wasser	169
6.2.6.	Freisetzung der Liposomen-MC E5-Einbettungen unter SINK-Bedingungen	171
6.2.7.	Ergebnisse der Freisetzungsprüfungen	172
6.3.	Vergleichende Prüfung der Liposomeneinbettungen	173
6.3.1.	Sprühtrocknungsprodukte ohne vorherige Liposomengewinnung	173
6.3.2.	Verhalten der Vergleichspräparate in Wasser	175
6.3.3.	Ergebnisse der Freisetzungsprüfungen unter SINK-Bedingungen	176
6.3.4.	Freisetzung in Phospholipid/Cholesterol-haltigen Lösungen	180
6.3.5.	Freisetzung unter NON-SINK-Bedingungen	184
6.3.6.	Ergebnisse	185
6.4.	Zusammenfassung	186

7.	Zusammenfassung der Arbeit	188
8.	Anhang	191
8.1.	Analysenmethoden	191
8.1.1.	Differential Scanning Calorimetry	191
8.1.2.	Differentialthermoanalyse	191
8.1.3.	Dünnschichtchromatographie	192
8.1.4.	Hochdruckflüssigkeitschromatographie	192
8.1.5.	Infrarotspektroskopie	193
8.1.6.	Polarisationsmikroskopie	193
8.1.7.	Rasterelektronenmikroskopie	193
8.1.8.	Röntgendiffraktometrie	193
8.1.9.	Thermogravimetrie	194
8.2.	Verwendete Geräte	195
8.3.	Verwendete Materialien	196
9.	Literaturverzeichnis	197
	Lebenslauf	213

1. Einleitung

1.1. Thematische Voraussetzungen der vorliegenden Arbeit

1.1.1. Parakristallinität und Polymorphie bei Digoxin und dessen Genin

Bei der Untersuchung des Einflusses von tribomechanischen Kräften auf die Eigenschaften des kristallinen Digoxins stellten FLORENCE et al. fest, daß mikronisierte Substanzproben in Wasser gegenüber unbehandeltem Ausgangsmaterial eine gesteigerte Lösungsgeschwindigkeit und Endlöslichkeit aufweisen (5). Diese Ergebnisse wurden von anderen Autoren bestätigt und auf den durch Mahlung bewirkten Verlust der Kristallinität zurückgeführt, d.h. durch tribomechanische Behandlung des Ausgangsmaterials wird eine in Abhängigkeit von den Mahlbedingungen auftretende Amorphisierung bewirkt (4,6). Weitere Verfahren zur Oberführung in den amorphen Zustand bestanden in der Sprühtrocknung (7) oder der Ausfällung aus organischen Lösungsmitteln im Rotationsverdampfer unter bestimmten Bedingungen (3).

DÖLLE (1,2) gelang es dann erstmalig neben voll amorphen Produkten auch parakristalline Zustandsformen des Digoxins darzustellen. So führte die Mahlung des durch Sprühtrocknung gewonnenen röntgenamorphen Wirkstoffs zu einem ebenfalls röntgenamorphen - im Polarisationsmikroskop jedoch anisotrop erscheinenden - parakristallinen Produkt ("Tribo-Produkt A"). Es ließ sich aber auch nachweisen, daß bei der Sprühtrocknung aus organischen Lösungsmitteln oder mit Hilfe eines speziellen Verfahrens (Dreistoffdüse) außer den überwiegend resultierenden hohlkugelförmigen amorphen Produkten auch parakristalline Formen entstehen.

Diese Entdeckung war um so erstaunlicher, als parakristalline Zustände bzw. mesomorphe Phasen vorher noch nicht bei amorphen, pharmazeutisch verwendeten Wirkstoffen beschrieben worden waren. Lediglich bei Hochpolymeren hatte man im festen Zustand bislang

strukturelle Ordnungen finden können, die dem flüssig-kristallinen Zustand zugeordnet werden konnten (8-13).

In diesem Zusammenhang gewann die Frage an Bedeutung, ob der Zuckeranteil im Digoxin-Molekül für die Ausbildung von Parakristallen bedeutsam ist.

DÖLLE hatte, bevor er die Parakristalle entdeckte, vermutet, daß die in der Literatur beschriebenen, stark differierenden Schmelztemperaturen von Digoxin auf eine Polymorphie hinweisen. Im Verlaufe seiner Untersuchungen konnte er aber diese Vermutung widerlegen (21).

Nach den Erfahrungen von KUHNERT-BRANDSTÄTTER ist im Prinzip jede Substanz als potentiell polymorph anzusehen. Es ist nur die Frage, ob es gelingt, die äußeren Bedingungen so zu gestalten, daß die Polymorphie auch in Erscheinung treten kann (14).

Die Verbreitung der Polymorphie macht eine 1978 von BURGER durchgeführte Recherche deutlich (22). Von den 162 in die Pharmakopöa Europaea aufgenommenen Substanzen treten ca. zwei Drittel mit mindestens zwei Kristallgitterstrukturen auf.

Die pharmazeutisch relevante Bedeutung der Polymorphie geht daraus hervor, daß bestimmte Modifikationen einer Substanz gravierende Unterschiede in der therapeutischen Wirkung aufweisen, was das bekannte Beispiel des Chloramphenicolpalmitats besonders einprägsam verdeutlicht:

1966 wurde vom National Biological Standards Laboratory in Canberra, Australien, festgestellt, daß eine Reihe von chloramphenicolpalmitathaltigen Präparaten unwirksam ist (23). AGUIAR (24, 25,26) und BORKA (27,28) gelang es in der Folgezeit mit verschiedenen Methoden drei unterschiedliche Kristallmodifikationen nachzuweisen, von denen sich die Form B - obwohl sie metastabil und wasserunlöslich ist - als einzige durch therapeutische Wirksamkeit auszeichnete.

Vor allem an den Wirkstoffgruppen der Barbiturate, Sulfonamide und Steroide wurden im Laufe der vergangenen Jahre umfangreiche

systematische Untersuchungen durchgeführt. So konnte KUHNERT-BRANDSTÄTTER bei der Untersuchung von ca. 100 Steroidhormonen an 60 % der Verbindungen Polymorphie beobachten (15-19). Daß solche Ergebnisse nicht als endgültig angesehen werden dürfen, zeigen unter anderem die Ergebnisse von SEILLER (20), der zu den schon bekannten Modifikationen des Betamethasonacetats eine weitere hinzufügte.

Digoxigenin weist - als das Aglykon des Digoxins - auch ein Steroidgrundgerüst auf (vgl. 2.1., S. 11), so daß es nicht überraschen würde, wenn im Gegensatz zum Glykosid polymorphe Modifikationen auftreten würden.

Vor einer Besprechung der Darstellung möglicher Digoxigeninmodifikationen soll auf biopharmazeutische Überlegungen eingegangen werden.

1.1.2. Biopharmazeutische Aspekte des Digoxigenins

Bei der Säurebehandlung von Digoxin erhält man, nachdem die drei Digitoxosemoleküle abgespalten worden sind, das Aglykon Digoxigenin.

Diese Hydrolyse ist von verschiedenen Arbeitskreisen unter in-vitro-Bedingungen in Abhängigkeit von pH-Wert, Zeit, Temperatur und Rührgeschwindigkeit untersucht worden. Die Ergebnisse stimmen in den wesentlichen Punkten überein und liefern das folgende Bild:

Bei pH-Werten von 3 und darüber verläuft die Hydrolyse unter in-vitro-Bedingungen bei einer Inkubationstemperatur von 310 K (37 ^{o}C) minimal. Drastisch nimmt die Hydrolysegeschwindigkeit jedoch bei pH-Werten von 2 bis 1 oder darunter zu. Bei einem pH-Wert von 2 sind nach 90 Minuten Inkubationszeit bei 310 K (37 ^{o}C) noch 62 % Digoxin vorhanden, bei pH 1,2 nach der gleichen Zeit nur noch 4 % nicht hydrolysiertes Digoxin (29). STERNSON und SHAFFER gin-

gen die Fragestellung von der mathematischen Seite an und fanden heraus, daß die Hydrolyse einer Reaktion 1. Ordnung folgt (30). Sie bestimmten die Geschwindigkeitskonstanten für pH 1 und 2 und stellten - wie auch andere Autoren (31,32) - fest, daß die Reaktion bei pH 1 um den Faktor 10 schneller verlief.

Ergebnisse aus eigenen Versuchen, die unter vergleichbaren Bedingungen durchgeführt wurden, untermauern dieses Ergebnis, wie die folgende Abbildung demonstriert.

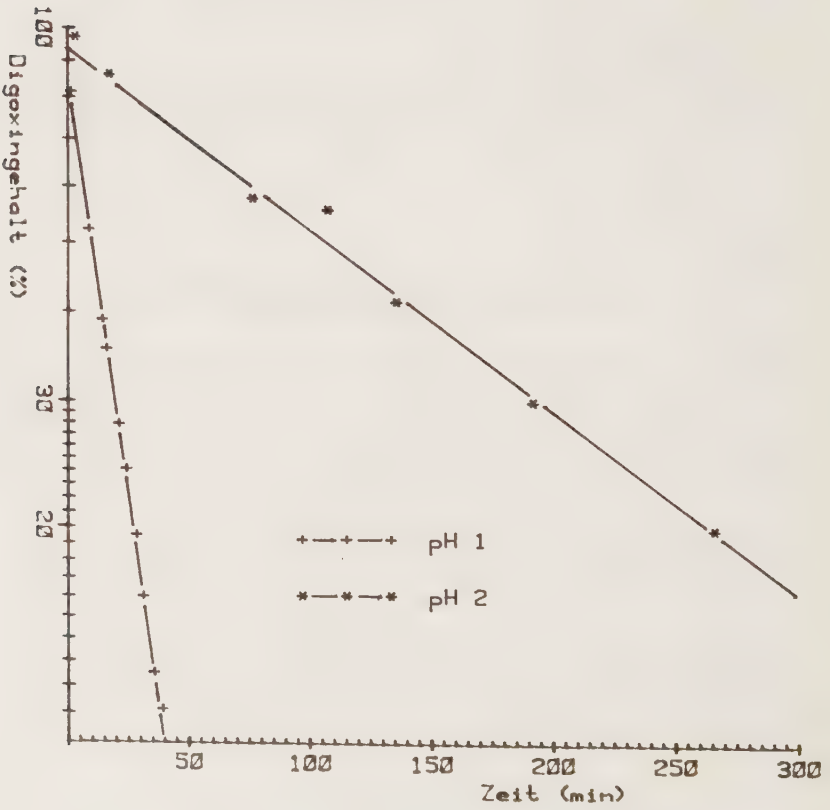


Abb. 1 Hydrolysegeschwindigkeit von Digoxin bei pH 1 und pH 2

Die gewählten Versuchsbedingungen sind in der folgenden Tabelle zusammengefaßt:

Tabelle 1 Hydrolysebedingungen

Einwaage	250 mg Digoxin gelöst in 5 ml Methanol
Inkubationsmedium	pH 1 : 0,1n HCl pH 3 : Citronensäure-Phosphat-Puffer
Temperatur	310 K (37 °C)
Rührgeschwindigkeit	250 U/min.
Gehaltsbestimmung	photometrisch bei 220 nm ($E^{1\%}_{1cm}$ = 335,3) nach HPLC-Auftrennung der Hydrolyseprodukte

In-vivo-Untersuchungen schließlich zeigten, daß die Hydrolyse im menschlichen Körper praktisch ebenso schnell abläuft wie in vitro. So fanden GAULT et al. nach 90 Minuten in Abhängigkeit von der gleichzeitig gemessenen H^+-Ionen-Aktivität im Magen nur noch zwischen 49,2 und 55,4 % an intaktem Digoxin. Bei der Gabe von Pentagastrin, einem Chemostimulator der Säureproduktion, konnte die Hydrolysegeschwindigkeit deutlich erhöht werden (33). Unter der Voraussetzung, daß für eine sichere therapeutische Glykosidwirkung das intakte Digoxin notwendig ist, kann davon ausgegangen werden, daß oral appliziertes Digoxin von Patient zu Patient im Magen unterschiedlich an biologischer Aktivität verliert und unter Umständen bei der Resorption im Dünndarm nicht mehr ausreichende Mengen für die Erhaltung wirksamer Blutspiegel zur Verfügung stehen (31).

Andere Autoren konnten zeigen, daß Digoxigenin, als Endprodukt der Säurehydrolyse, nach oraler Gabe ebenfalls im Dünndarmbereich resorbiert wird (34,35). Da es weit weniger polar ist als Digoxin, wird vermutet, daß pro Zeiteinheit im Dünndarm mehr resorbiert wird (33).

Bedeutsam ist in diesem Zusammenhang die Beobachtung aus eigenen Versuchen, die die Lösungseigenschaften von Digoxigenin betrafen. Ganz im Gegensatz zu der Meinung, die noch in den Lehrbüchern vertreten wird, löst sich dieser Stoff relativ gut in Wasser. Die Sättigungslöslichkeit von D i g o x i n beträgt 4 mg/100 ml, was 1 mmol/ml entspricht. Von D i g o x i g e n i n hingegen lösen sich bis zu 13 mg/100 ml, entsprechend 3 mmol/ml. Dieser Unterschied kommt in der folgenden Abbildung graphisch zum Ausdruck.

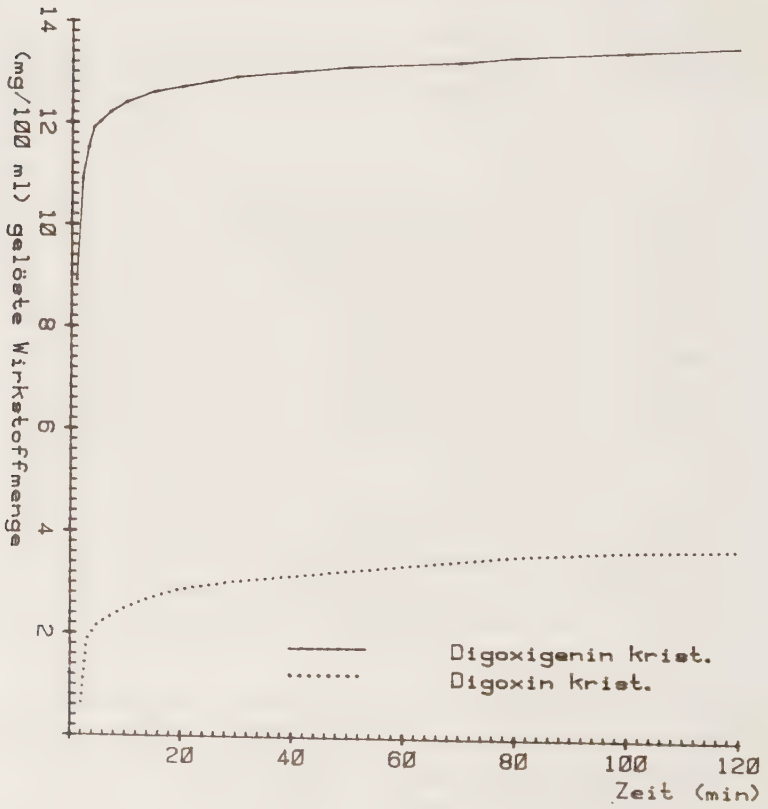


Abb. 2 Vergleich des Lösungsverhaltens von Digoxin und Digoxigenin in Wasser
(zu den Versuchsbedingungen s. 5.3.2., S. 113)

Der genaue Wirkungsmechanismus der herzwirksamen Glykoside ist bis heute nicht eindeutig geklärt. Als Herzglykosidrezeptor wird allgemein die Na^+/K^+-aktivierbare ATPase der Zellmembran, die den aktiven Na^+-K^+-Transport durch die Zellmembran katalysiert, angesehen (40,51,55,56). Der Zusammenhang zwischen der Hemmung dieser Na^+/K^+-ATPase und der positiv inotropen Wirkung von Herzglykosiden wurde von verschiedenen Autoren aufgezeigt (41-44). Es konnte bewiesen werden, daß die zuckerfreien Genine, wie z.B. das Digoxigenin, eine nahezu ebenso starke Substanz-Enzym-Komplexbindung eingehen wie die entsprechenden Glykoside (45,46).

Das Digoxigenin ist demnach, wie auch die anderen Hydrolyseprodukte, noch herzwirksam. Man geht davon aus, daß die positiv inotrope Wirkung des Digoxigenins zwischen einem Zehntel (36) und einem Drittel (37) der Wirkungsstärke von Digoxin liegt. Diese Herzwirksamkeit wird jedoch nicht von den gebräuchlichen Verfahren wie Enzym- (EIA) oder Radioimmunoassay (RIA), die dazu dienen, den Digoxingehalt im Blut zu ermitteln, erfaßt, da sie nicht auf die Spaltprodukte ansprechen (33).

Die Elimination aus dem Körper ist gegenüber Digoxin ebenfalls beschleunigt. Die Plasmahalbwertszeit beträgt nur zwischen 2 (38) und 3 (35) Stunden, während sie für Digoxin zwischen 1,3 und 7 Tagen liegt (38,39).

1.1.3. Sprüheinbettungen unter Einsatz von Phospholipiden

NÖRNBERG konnte an einer Reihe von Beispielen nachweisen, daß sich an sich schwer wasserlösliche Wirkstoffe durch die Sprühtrocknung in Produkte überführen lassen, die gegenüber dem Ausgangsmaterial eine erhöhte Lösungsgeschwindigkeit und eine gesteigerte Löslichkeit aufweisen. Durch das gleichzeitige Versprühen verschiedener Hilfsstoffe makromolekularer Natur erhält man sogenannte Sprüheinbettungen, die beim in-vitro-Versuch in Wasser

eine anhaltende Übersättigung, bezogen auf den Wirkstoff, verursachen (48,49).

DÖLLE stellte aus einer Digoxin/Methylcellulose (MC)-Sprüheinbettung geeignete Tabletten her und zeigte sowohl im Tier- als auch im Humanversuch, daß diese Technik durch die erzielte Resorptionssteigerung zu einer besseren Bioverfügbarkeit gegenüber handelsüblichen Tablettenpräparaten führte (21).

Es stellte sich nun die Frage, in welchem Maße sich beim Digoxigenin auch ein verbessertes Lösungsverhalten durch den Einsatz von Sprüheinbettungen erzielen ließe. Ob lösungsvermittelnde Tenside eine weitere Steigerung bewirken, sollte durch den Zusatz entsprechender Stoffe zur Sprüheinbettung untersucht werden. Bei der Auswahl der Lösungsvermittler schienen besonders Lecithine interessant zu sein, da diese physiologisch unbedenklich sind, was ihre Verwendung bei parenteral applizierbaren Präparaten deutlich werden läßt.

In den letzten Jahren haben Lecithine bei der Gewinnung von Lipidvesikeln, den L i p o s o m e n , an Bedeutung gewonnen. Liposomen entstehen im allgemeinen nach der feinen Dispergierung von Lecithin in Wasser. Sie unterscheiden sich von den Solubilisaten dadurch, daß sie auch bei Verdünnung mit Wasser oder wäßrigen Körperflüssigkeiten ihren "Formkörpercharakter" nicht zwangsläufig verlieren. Dieses wäßrige Medium ist aber auf der anderen Seite für die Instabilität der Liposomen bei länger dauernder Lagerung verantwortlich, weil es die Ursache für zerstörerische Folgereaktionen darstellt. Es muß folglich nach Verfahren gesucht werden, der wäßrigen Liposomendispersion das Wasser zu entziehen, ohne daß die morphologische Struktur der Liposomen verlorengeht. Die Sprüheinbettung könnte ein solches Verfahren darstellen, da sie sich bei der Stabilisierung empfindlicher Wirkstoffe, z.B. dem Vitamin B_{12}, als schonende Technik bewährt hat (47). Durch gleichzeitiges Versprühen von Kolloiden und Liposomen könnten letztere in eine sogenannte Sprüheinbettung überführt werden. Die resultierende Feststoffmatrix könnte die physikalischen Eigen-

schaften der Liposomen positiv beeinflussen und gleichzeitig die Voraussetzung für die Verarbeitung in feste Arzneiformen schaffen. Dies würde neue Perspektiven eröffnen, da alle bisher eingesetzten Liposomen enthaltenden Arzneiformen ein wäßriges System darstellten, d.h. es kamen Cremes und Injektabilia zum Einsatz.

Einem inkorporierten Wirkstoff kommt in einer Sprüheinbettung ein ganz anderer Verteilungszustand zu, als ihm in sprühgetrockneten Liposomen zukommen würde. Es wäre von Interesse, welchen Einfluß dieser Unterschied auf das Freisetzungsverhalten des Wirkstoffes aus den beiden unterschiedlichen Präparaten ausüben würde.

1.2. Zielsetzung

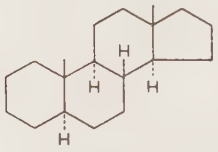
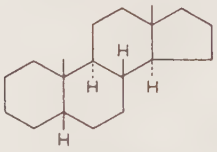
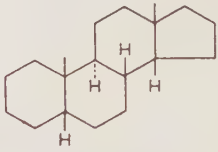
Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit läßt sich aus dem in der Einleitung Gesagten in die folgenden Fragestellungen zusammenfassen:

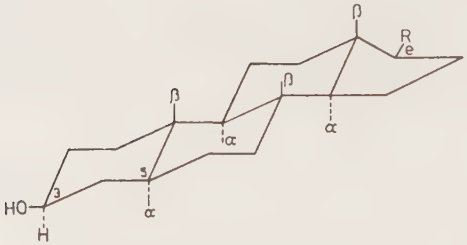
- Läßt sich am Aglykon des Digoxins, dem Digoxigenin, aufgrund seines steroidartigen Aufbaus Polymorphie nachweisen?
- Welche der möglicherweise verschiedenen Modifikationen ist aufgrund ihrer physikalisch-chemischen Eigenschaften für die pharmazeutische Anwendung besonders gut geeignet?
- Kann Digoxigenin wie das Glykosid in den amorphen Zustand überführt werden?
- Welche verfahrenstechnischen Voraussetzungen müssen für die Stabilisierung der erhaltenen Produkte gegeben sein?
- Weist das eventuell vollamorphe Produkt ähnlich gute Lösungseigenschaften auf wie das Glykosid?
- Sind bei Digoxigenin wie bei Digoxin parakristalline Zustände festzustellen?
- Welchen Einfluß üben Kolloide auf die Lösungseigenschaften von Digoxigenin aus?
- Können die ermittelten Eigenschaften durch den Zusatz von Tensiden - unter besonderer Berücksichtigung von Phospholipiden - noch weiter gesteigert werden?
- Lassen sich mit den gleichen Phospholipiden digoxigeninhaltige Liposomen darstellen?
- Können die möglicherweise erhaltenen Liposomen zusammen mit Kolloiden versprüht werden, ohne daß die Liposomen zerstört werden?
- Welches Freisetzungsverhalten zeigt Digoxigenin aus diesem speziellen Systemen im Vergleich zu Hydrokolloid-Sprüheinbettungen, bei denen es molekulardispers mit den gleichen Phospholipiden verteilt ist?

2. Der Wirkstoff

2.1. Chemie des Digoxigenins

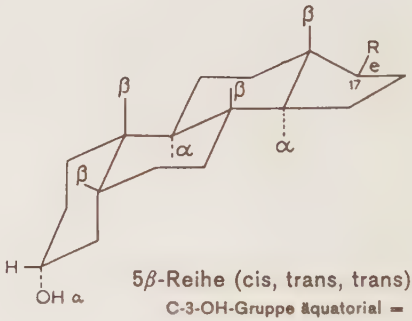
Aus der Bezeichnung 4-[3,12,14-Trihydroxy-10,13-dimethyl-hexadecahydro-cyclo-penta[a]phenanthren-17-yl]-5H-furan-2-on wird deutlich, daß Digoxigenin ($C_{23}H_{34}O_5$, M_r 390,52) zu der großen Familie der Steroide gehört. Während die vier Ringe des Steringerüsts bei der α-Cholestan-Reihe trans-trans-trans und bei der β-Cholestan-Reihe cis-trans-trans verbunden sind, sind sie bei Digoxigenin cis-trans-cis verknüpft. Als Aglykon des Digoxins, eines Herzglykosids, gehört es zur sogenannten Cardenolidreihe. Die folgende Abbildung zeigt die angesprochenen Konformationsverhältnisse (52).

A/B: trans B/C: trans C/D: trans	cis trans trans	cis trans cis
		
5α-Reihe Cholestan-Reihe	5β-Reihe Koprostan-Reihe	Cardenolid-Reihe



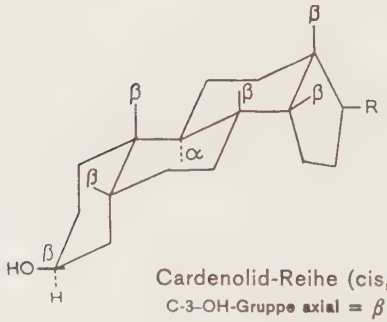
5α-Reihe (trans, trans, trans)

C-3-OH-Gruppe äquatorial = β



5β-Reihe (cis, trans, trans)

C-3-OH-Gruppe äquatorial = α



Cardenolid-Reihe (cis, trans, cis)

C-3-OH-Gruppe axial = β

Abb. 3 Die Steroidtypen in Konformationsformeln nach AUTERHOFF (52)

Die Cardenolide enthalten an C3 und C14 ß-ständige Hydroxylgruppen und an C10 und C13 ebenfalls ß-ständige Methylgruppen. Digoxigenin weist zusätzlich zum eben beschriebenen Grundgerüst noch eine ß-ständige Hydroxylgruppe an C12 auf. Als charakteristische Gruppe tragen sie an C17 einen ß-ständigen α,ß-ungesättigten Lactonring (53).

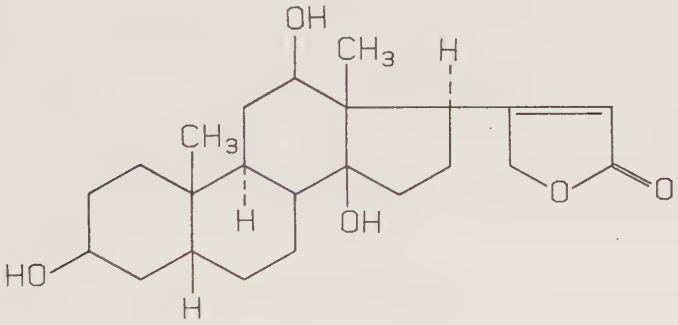


Abb. 4 Strukturformel von Digoxigenin

Diese Seitenkette wird als essentiell für die pharmakologische Wirksamkeit betrachtet. Abspaltung des Ringes oder Änderung der Konfiguration führen zu einem vollständigen Wirkungsverlust. Modifizierungen an der 3ß-Hydroxylgruppe, an den Strukturen an C14 und C15 und an der Verknüpfung der Ringe A/B, sowie C/D führen ebenfalls zu einer Wirkungsabnahme. Vollständige Kenntnisse über die Struktur-Wirkungs-Beziehungen liegen aber bis heute nicht vor (54).

2.2. Pharmazeutisch relevante Eigenschaften in der Literatur

Durch glykosidische Verknüpfung mit 3 Molekülen Digitoxose bildet Digoxigenin das Herzglykosid Digoxin. Digoxin hat aufgrund seiner pharmakologischen Bedeutung in alle wichtigen Arzneibücher wie dem Europäischen Arzneibuch, der Britischen und Amerikanischen Pharmakopöe (57,58,59) Eingang gefunden. Spezielle Informationen über das Genin findet man dagegen nicht in Arzneibüchern, sondern nur in chemisch ausgerichteten Nachschlagewerken wie dem Beilstein'schen Handbuch (60).

Auffällig sind in diesem Werk die Angaben zum Schmelzpunkt. In Abhängigkeit vom Lösungsmittel, aus dem Digoxigenin auskristallisiert wurde, bewegen sich die gefundenen Werte zwischen 479 K (206 ^{o}C) und 495 K (222 ^{o}C). Die Substanz schmilzt erstmalig bei 408 K (135 ^{o}C) und nach Wiedererstarren erneut bei 478 K (205 ^{o}C), wenn aus wäßrigem Alkohol kristallisiert wurde.

Der Merck-Index (61) gibt den Schmelzpunkt mit 495 K (222 ^{o}C) an und erwähnt daneben die Existenz eines Dihydrats, allerdings ohne Nennung des zugehörigen Schmelzpunktes. Auch die diesem Zitat zugrundeliegende Originalveröffentlichung (62) liefert keine näheren Anhaltspunkte zum wasserhaltigen Digoxigenin.

2.3. Weitere experimentell ermittelte Eigenschaften

Für eigene Untersuchungen stand Digoxigenin in drei Mustern unterschiedlicher Herkunft zur Verfügung:

A) von der Firma FLUKA,
B) von der Firma MERCK, Darmstadt, und
C) durch Hydrolyse von Digoxin nach der Vorschrift von SMITH (62) gewonnene Proben.

Bei A) und B) war nicht in Erfahrung zu bringen, welches Verfahren zur Gewinnung verwendet worden war. Der FLUKA-Katalog (64) gibt für sein Produkt einen Wassergehalt von 2 bis 4 Prozent an, nennt aber keinen Schmelzpunkt. SMITH gibt 495 K (222 ^{o}C) an und spricht von 2 Mol Kristallwasser pro Molekül Digoxigenin.

Um diese lückenhaften Angaben zu ergänzen und vergleichbare Werte zu erhalten, wurden differentialthermoanalytische Bestimmungen unter identischen Bedingungen durchgeführt. Die Differentialthermoanalyse (DTA) bietet ja bekanntlich die Möglichkeit, Umwandlungswärmen, die mit chemischen oder physikalischen Substanzänderungen verbunden sind, als Funktion der Temperatur während einer gleichförmigen Aufheizung der Substanz aufzuzeichnen (78). Das folgende Diagramm zeigt die erhaltenen DTA-Kurven für die drei Muster.

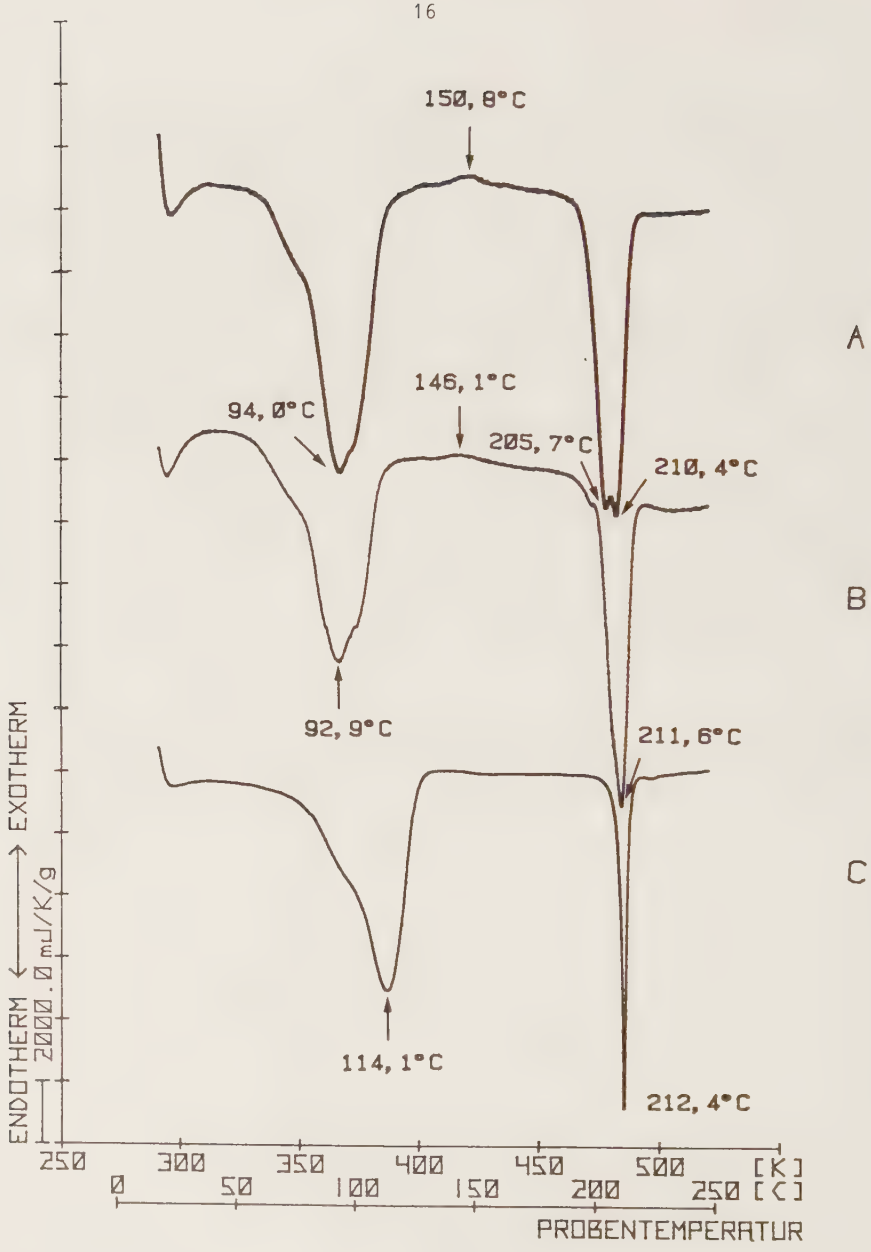


Abb. 5 DTA-Kurven von Digoxigeninmustern
A) FLUKA B) MERCK C) Hydrolyse nach SMITH

Alle drei Kurven zeigen eine ausgeprägte endotherme Auslenkung mit einem Maximum bei ca. 373 K (100 °C), wahrscheinlich verursacht durch das entweichende Wasser. Diese Vermutung wurde durch Wasserbestimmungen nach KARL FISCHER bekräftigt, die einen Gehalt zwischen 4,3 und 4,5 %, je nach Probe, erbrachten. Bei den Kurven A) und B) folgt darauf ein kleiner exothermer Peak bei etwa 423 K (150 °C). Der Schmelzvorgang setzt bei etwa 463 K (190 °C) ein und erreicht sein Maximum bei ca. 483 K (210 °C). Dieser endotherme Peak ist bei Charge C) ausgesprochen scharf, während er bei A) und B) relativ breit ausfällt. Beim FLUKA-Produkt A) weist er sogar zwei diskrete Spitzen auf. Bemerkenswert ist die Tatsache, daß das nach SMITH gewonnene Digoxigenin nicht erst bei 495 K (222 °C), sondern wie die anderen bei 483 K (210 °C) schmilzt.

Die Interpretation von DTA-Kurven wird im allgemeinen durch thermogravimetrische Untersuchungen erleichtert, wenn die beobachteten Vorgänge mit einem Gewichtsverlust einhergehen.
Bei der Thermogravimetrie (TG) wird nämlich eine Probe - wie bei der DTA - linear aufgeheizt und gleichzeitig ihr Gewicht registriert. Der tatsächliche Wassergehalt ließ sich folglich mit dieser Methode einfach ermitteln.

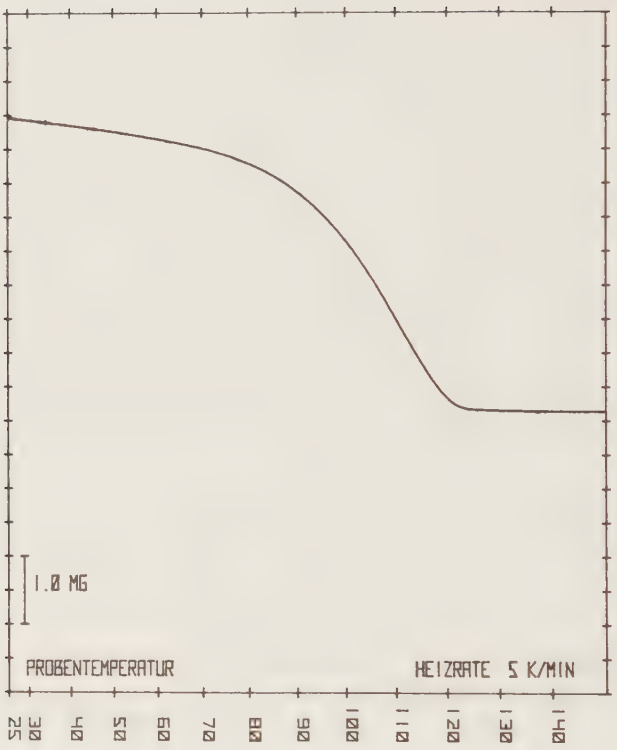


Abb. 6 TG-Kurve von Digoxigenin (Einwaage 98,8 mg)

Da bei den drei Chargen, bezogen auf den Kurvenverlauf, das gleiche Ergebnis erhalten wurde, steht das folgende Bild für das Produkt C) auch stellvertretend für die beiden anderen Chargen. Der Wasserverlust setzt, beginnend bei der Starttemperatur von 298 K (25 ^{o}C), sofort ein und nimmt mit steigender Temperatur immer stärker zu. Da die gleiche Aufheizrate wie bei der DTA (5 K/min) gewählt wurde, korrelieren die bei beiden Verfahren erhaltenen "Wasserkurven" sehr gut.

Die folgende Tabelle faßt die erhaltenen Meßergebnisse zusammen:

Tabelle 2 Ergebnisse der thermoanalytischen Untersuchungen

	Schmelztemperatur (K)	Schmelztemperatur (°C)	Wassergehalt [%(G/G)]
A) FLUKA	478,7 483,4	205,7 210,4	4,4
B) MERCK	484,6	211,6	4,4
C) nach SMITH	485,4	212,4	4,3

Angebracht sei schon hier die Feststellung, daß der ermittelte Wassergehalt - der im übrigen den FLUKA-Angaben nahekommt - für die von SMITH erwähnte Existenz eines Dihydrats zu niedrig ist. Da ein Dihydrat eine relative Molmasse von 426,54 hätte, müßte der Wassergehalt theoretisch bei 8,4 % liegen. Der Frage, ob ein Hydrat vorliegt, wird in Kapitel 3, S. 26, nachgegangen.

2.4. Deutungsvorschläge für die unterschiedlichen thermischen Eigenschaften

Als Erklärung für die in der Literatur gefundenen unterschiedlichen Aussagen und den selbst ermittelten Ergebnissen kommen folgende Möglichkeiten in Frage:

1. Verunreinigungen

Digoxigenin wird durch Hydrolyse aus Digoxin gewonnen, denn die Totalsynthese wäre sehr aufwendig. Da aber bereits handelsübliches Digoxin immer durch Begleitglycoside verunreinigt ist, wenn auch in geringer Menge (maximal 4 % nach Ph.Eur. II) - die vollständige Abtrennung derselben wäre zu schwierig - ist das eine nicht sehr naheliegende Vermutung. Jedoch entstehen bei der Abspaltung der Zucker im Rahmen der Geningewinnung Nebenprodukte

in größerer Menge (z.B. Mono- und Bisdigitoxoside), die, sofern sie nicht vollständig abgetrennt werden, das physikalische Verhalten des Digoxigenins verändern.

2. Hydratbildung, Solvatbildung

In Anbetracht des erwähnten wasserhaltigen Digoxigenins steht auch diese Möglichkeit zur Diskussion. Lösungsmittelmoleküle, die in das Kristallgitter eingebaut wurden, haben ganz wesentliche Änderungen der Kristalleigenschaften zur Folge (15). Dieser Sachverhalt wird bekanntlich als Pseudopolymorphie bezeichnet.

3. Polymorphie

Die differierenden Schmelztemperaturen lassen auch eine echte Polymorphie vermuten, unter der man im Gegensatz zur Pseudopolymorphie versteht, daß eine Substanz in verschiedenen Kristallstrukturen existieren kann, die als Modifikationen bezeichnet werden. Die Unterschiede beschränken sich also auf Anordnung und Packung desselben Moleküls im Kristallgitter (63). Daraus folgt, daß sich Modifikationen einer Substanz aus chemischer Sicht völlig identisch verhalten.

Welche dieser Möglichkeiten nun zutreffen, soll im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden.

2.5. Reinheitsuntersuchungen

Bei der Klärung des 1. Gesichtspunktes von 2.4., S. 19 (die möglichen Verunreinigungen der Digoxingeninchargen betreffend) mußte berücksichtigt werden, daß Digoxin, aus dem die Charge C gewonnen wurde (vgl. 2.3., S. 14), seinerseits schon verunreinigt sein könnte. Zur Überprüfung der Reinheit wurden die entsprechenden Vorschriften des Europäischen Arzneibuchs herangezogen. Der Gehalt der Begleitglycoside blieb deutlich unter den vom Arzneibuch

tolerierten Werten, das maximal 5 % Digitoxin und 4 % Gitoxin zuläßt. Auch die weiteren Reinheitskriterien wurden erfüllt. Die Digoxigeninchargen A, B und C wurden nun sowohl dünnschichtchromatographisch, als auch mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie auf Verunreinigungen, bedingt durch den Gewinnungsprozeß, untersucht.

2.5.1. Reinheitsuntersuchungen mittels Dünnschichtchromatographie (DC)

Der Frage nach Hydrolysenebenprodukten in den drei Digoxigeninchargen wurde mittels dünnschichtchromatographischer Methoden nachgegangen (80). Aus einer Vielzahl von Veröffentlichungen (z. B. 65-68) wurde eine gewählt, die die qualitative und quantitative Erfassung von Metabolismusprodukten verschiedener Herzglykoside beschreibt (69).

Es kamen solche Fließmittelsysteme zum Einsatz, die die beste Auftrennung von Digoxigenin und seinen zuckerhaltigen Derivaten gewährleisteten; sie sind im Anhang aufgeführt. Die folgende Tabelle enthält die für System A ermittelten hR_f-Werte.

Tabelle 3 Ermittelte hR_f-Werte

Digoxigenin	24
Digoxigeninmonodigitoxosid	19
Digoxigeninbisdigitoxosid	11
Digoxin	8

Die Abbildung 7 zeigt ein Chromatogramm, das im Fließmittelsystem A entwickelt wurde.

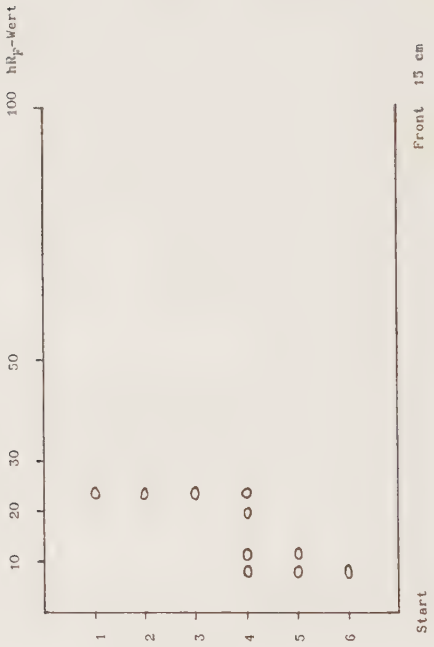


Abb. 7 Dünnschichtchromatogramm aus Fließmittel A

1) Digoxigenin FLUKA
2) Digoxigenin MERCK
3) Digoxigenin nach SMITH
4) Digoxin MERCK nach Hydrolyse (vgl. Text)
5) Digoxin MERCK
6) Digoxin CRS (Referenzsubstanz nach Ph.Eur. II)

Alle drei Digoxigeninchargen zeigen keine weiteren Flecken, die auf Digitoxoside hinweisen würden. Als Referenz diente eine Probe, die kurz nach dem Start eines Hydrolyseansatzes nach SMITH gezogen wurde: deutlich sind das Mono- und das Bisdigitoxosid

neben Digoxin und Digoxigenin zu erkennen. Interessanterweise enthielt auch das Ausgangsprodukt Digoxin schon Bisdigitoxosidanteile.

2.5.2. Reinheitsuntersuchungen mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Auch im Hinblick auf spätere Freisetzungsprüfungen mußte eine HPLC-Methode gefunden werden, die es gestattete, schnelle Aussagen über die quantitative und unter Umständen auch qualitative Zusammensetzung einer Analysenlösung zu machen (76). Da es sich um in-vitro-Prüfungen handelte, bewegten sich die zu erwartenden Konzentrationen im Bereich von 20 ng/ml. Aufgrund dieser relativ hohen Konzentration konnte bei der Detektion auf eine Derivatisierung, z.B. mit 4-Nitrobenzoylchlorid (70), oder auf den Einsatz eines Radioimmunoassays (71) im Anschluß an die chromatographische Trennung verzichtet werden. Die photometrische Detektion bei 220 nm, die auf dem Absorptionsvermögen des α,β-ungesättigten Lactonrings im Digoxigenin beruht, erwies sich als völlig ausreichend.

Für qualitative Untersuchungen im Rahmen der Reinheitsprüfungen mußte berücksichtigt werden, daß die Polarität von Digoxigenin über Mono- und Bisdigitoxosid zum Digoxin hin abnimmt. Es war aber nicht nötig, die Zusammensetzung der mobilen Phase während des Trennungsvorgangs auf der Säule zu ändern, also eine sogenannte Gradient-Elution (77) durchzuführen, da mittels isokratischer Arbeitsweise die maximalen Retentionszeiten in einem sinnvollen Bereich gehalten werden konnten.

Die quantitative Erfassung des Digoxigenins erfolgte über einen inneren Standard. Hierfür erwies sich Phenytoin (72) als geeignet, da es unter den gewählten Bedingungen bezüglich seiner Retentionszeit mit keiner der interessierenden Verbindungen interferierte.

Die genauen Versuchsresultate können der folgenden Tabelle entnommen werden.

Tabelle 4	Ermittelte Retentionszeiten	
	Digoxigenin	2:11 Min.
	Phenytoin	3:21 Min.

Einem einfach zusammengesetzten Eluenten wurde der Vorzug gegeben, da er sich für spezielle Aufgabenstellungen leichter modifizieren läßt. Mobile Phasen aus drei oder mehr Komponenten (z. B. 74,75) kamen daher nicht zum Einsatz.

Die folgende Abbildung zeigt ein unter den oben genannten Bedingungen erhaltenes Chromatogramm.

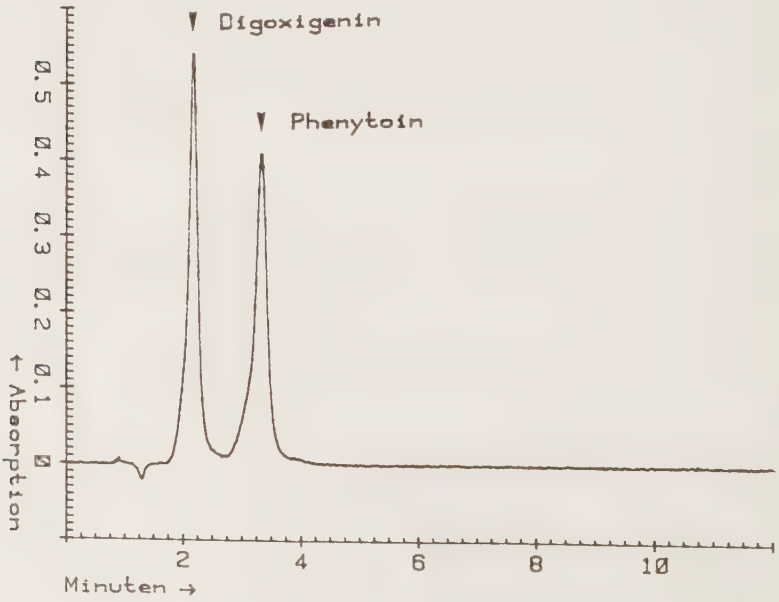


Abb. 8 HPLC-Chromatogramm von Digoxigenin/Phenytoin 1 : 1

Mittels HPLC konnten die durch DC gewonnenen Ergebnisse bestätigt werden: alle drei Digoxigeninchargen waren bezüglich zuckerhaltiger Verbindungen als rein einzustufen.

Im folgenden Kapitel soll nun die Fragestellung der Pseudopolymorphie diskutiert werden.

3. Das wasserhaltige Digoxigenin

Die in Abbildung 5 (vgl. 2.3., S. 16) dargestellten DTA-Kurven lassen eine endotherme Auslenkung bei 373 K (100 °C) erkennen, was auf die Anwesenheit von entweder sorptiv oder hydratartig gebundenem Wasser hindeuten könnte. Zur Klärung dieser Frage, in welcher Form das Wasser enthalten ist, wurde zunächst eine Ausfällung des Digoxigenins in wäßrigem Medium vorgenommen.

3.1. Ausfällung in Wasser

Eine Ausfällung unter reproduzierbaren Bedingungen stellt ein Verfahren dar, das schon MUCKENSCHNABEL (83) zur Darstellung von Corticoid-Hydraten beschrieben hat.

Definierte Mengen Substanz wurden in wenig Methanol gelöst und bei Raumtemperatur in einem Überschuß Wasser wieder ausgefällt. Die so erhaltenen nadelförmigen Kristalle wurden mit einer Filternutsche abgetrennt, eine Stunde bei 373 K (100 °C) getrocknet und anschließend 4 Wochen in einem geschlossenen Gefäß bei Raumtemperatur gelagert.

Tabelle 5 Versuchsparameter:

Ausgangsmenge	250 mg
Lösungsmittel CH_3OH	5 ml
Mischbares Nichtlösungsmittel H_2O	250 ml
Ausbeute	70 %

3.2. Anwendung verschiedener thermoanalytischer Untersuchungsverfahren

3.2.1. Differentialthermoanalyse und Thermogravimetrie

DTA-Messungen im Anschluß daran erbrachten im Gegensatz zu den Untersuchungen des Ausgangsmaterials ein erstaunlich übersichtliches Ergebnis: alle 3 Kurven waren praktisch identisch. Die folgende Tabelle gibt die Lage der endothermen Maxima an.

Tabelle 6 Endotherme DTA-Peaks der in Wasser ausgefällten Digoxigeninchargen

	endotherm	
FLUKA	372,6 K (99,6 °C)	482,0 K (209,0 °C)
MERCK	304,1 K (91,1 °C)	482,1 K (209,1 °C)
nach SMITH	372,7 K (99,7 °C)	484,7 K (211,7 °C)

Den Kurvenverlauf des FLUKA-Produkts zeigt die folgende Abbildung:

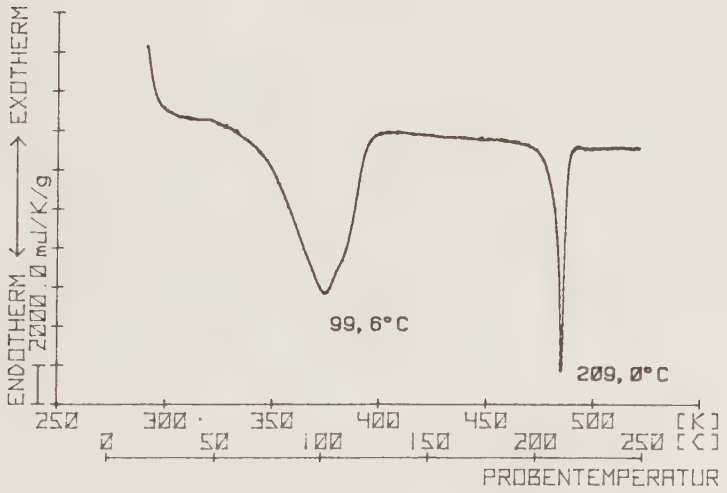


Abb. 9 DTA-Kurve von Digoxigenin FLUKA nach Ausfällung in Wasser

Der endotherme Wasserpeak ohne nachfolgende exotherme Auslenkung ist gegenüber Abbildung 5 gleichgeblieben. Aber der Schmelzpeak ist in auffälliger Weise schärfer geworden und weist auch keine 2 Maxima mehr auf.

Dieses Schärferwerden war ebenfalls bei der MERCK-Charge zu beobachten, während sich das SMITH-Produkt nicht veränderte.

Die schwachen, aber deutlich erkennbaren exothermen Maxima im Bereich von 413 K (140 °C), die bei den Ausgangssubstanzen "FLUKA" und "MERCK" zu erkennen waren (vgl. Abb. 5), waren nach der Ausfällung nicht mehr zu erkennen.

Die Schmelzpunkte der 3 Chargen liegen jetzt so dicht beieinander, daß davon ausgegangen werden kann, daß die Ausfällung zu einem identischen Produkt geführt hat. Unterstützt wird diese Vermutung noch dadurch, daß der thermogravimetrisch ermittelte Wassergehalt einheitlicht bei 4,5 % lag.

3.2.2. Allgemeine Bemerkungen zur Röntgendiffraktometrie

Es interessierte nun, in welcher Weise sich der Kristallhabitus durch die Wasserabgabe ändert.

Ein geeignetes Verfahren zur Erkennung dieser Änderung besteht in der Röntgenanalyse einer gegebenen Pulverprobe, d.h. in der sogenannten Pulverdiffraktometrie.

Kristallines Pulver liefert nämlich charakteristische Röntgenbeugungsmuster aus Peaks definierter Lage und Intensität. Mit Hilfe der Bragg'schen Gleichung können aus den 2Θ-Werten dieser Peaks die Netzebenenabstände des Kristallgitters berechnet werden, sofern die Wellenlänge der Röntgenstrahlung bekannt ist:

$$n \cdot \lambda = 2\, d \sin \Theta \quad (86) \qquad \text{(Gl. 1)}$$

$n\lambda$ = ganzzahliges Vielfaches der Wellenlänge der verwendeten Röntgenstrahlung
(hier Cu $K_{\alpha_{1/2}}$: λ = 1,5418 Å)
d = Netzebenenabstand
Θ = Beugungswinkel

Um optimale Intensitäten zu erhalten und durch den Probenträger verursachte Fremdlinien auszuschalten, darf einerseits eine gewisse Schichtdicke der Untersuchungssubstanz nicht unterschritten werden. Mit Hilfe der folgenden Formel läßt sich diese m i n i m a l e D i c k e t berechnen:

$$t = \frac{3{,}2\ \rho}{\mu\rho'} \sin\Theta \quad (87) \qquad \text{(Gl. 2)}$$

t = Schichtdicke in cm
μ = linearer Absorptionskoeffizient
ρ = Dichte der Probe
ρ' = Dichte der Füllung

Andererseits werden reproduzierbare Intensitätswerte nur erhalten, wenn die einzelnen Kristalle der Pulvermischung eine m a x i m a l e T e i l c h e n g r ö ß e nicht überschreiten (88). Ferner ist ein Vergleich der Intensitätswerte nur unter der Voraussetzung möglich, daß die Untersuchungsproben die gleiche Korngrößenverteilung aufweisen.

Eine Änderung des Kristallinitätsgrades läßt sich durch die Bestimmung des Kristallitätsindexes (KI) nach der von BLACK und LOVERING entwickelten Methode (6) festhalten.

In der vorliegenden Arbeit wurde der KI unter Verwendung eines Rechnerprogramms ermittelt, das die gespeicherten Intensitätswerte einer durch Sprühtrocknung gewonnenen vollständig amorphen Probe (vgl. 4.1.3., S. 60) mit denen der Untersuchungsprobe in Beziehung setzt. Durch diese Untersuchung kann das Auftreten polymorpher bzw. pseudopolymorpher Modifikationen nachgewiesen werden. Beobachtet man eine Abschwächung der Reflexe unter gleichzeitiger Ausbildung sogenannter amorpher Halos, kann auf die Änderung des KI geschlossen werden.

3.2.3. Röntgendiffraktometrie bei steigenden Temperaturen

Das Prinzip der DT-Analysentechnik besteht darin, daß Zustandsänderungen in einem dynamischen Aufheizvorgang dargestellt werden können. Eine Interpretation der endo- bzw. exothermen Signale durch RD-Kontrolluntersuchungen erlaubt weitergehende Aussagen. Allerdings ist dieses Verfahren zeitaufwendig, da für jeden Temperaturwert ein gesondertes Diffraktogramm aufgenommen werden muß. Die Diffraktogramme zeigen, ob die durch die DTA ausgewiesenen endo- oder exothermen Vorgänge mit einer Änderung der Kristallstruktur einhergehen oder nicht.

Der Einfluß erhöhter Temperaturen konnte festgestellt werden, da ein Zählrohrdiffraktometer, das als Hochtemperaturkammer gebaut war, zur Verfügung stand. In einem solchen Gerät befindet sich die Probe in einem Träger aus einer Speziallegierung, der mittels Widerstandsheizung aufgeheizt werden kann.

Ausgehend von der Raumtemperatur (293 K, 20 ^{o}C) wurde also immer nach einem Durchlauf, der ca. 25 Minuten dauerte, die Heiztemperatur um 10 K erhöht.

In der folgenden Abbildung 10, die die Röntgendiffraktogramme bei 293 K (20 ^{o}C), 313 K (40 ^{o}C), 343 K (70 ^{o}C), 373 K (100 ^{o}C), 403 K (130 ^{o}C) und 433 K (160 ^{o}C) zeigt, kommt die fortlaufende Entwicklung deutlich zum Ausdruck.

Es fällt auf, daß die Höhen vergleichbarer Peaks, d.h. die pro Sekunde registrierten Impulse, mit zunehmender Temperatur Veränderungen aufweisen; besonders ab Röntgendiffraktogramm Nr. D (373 K, 100 ^{o}C) tritt dieser Vorgang stark in Erscheinung.

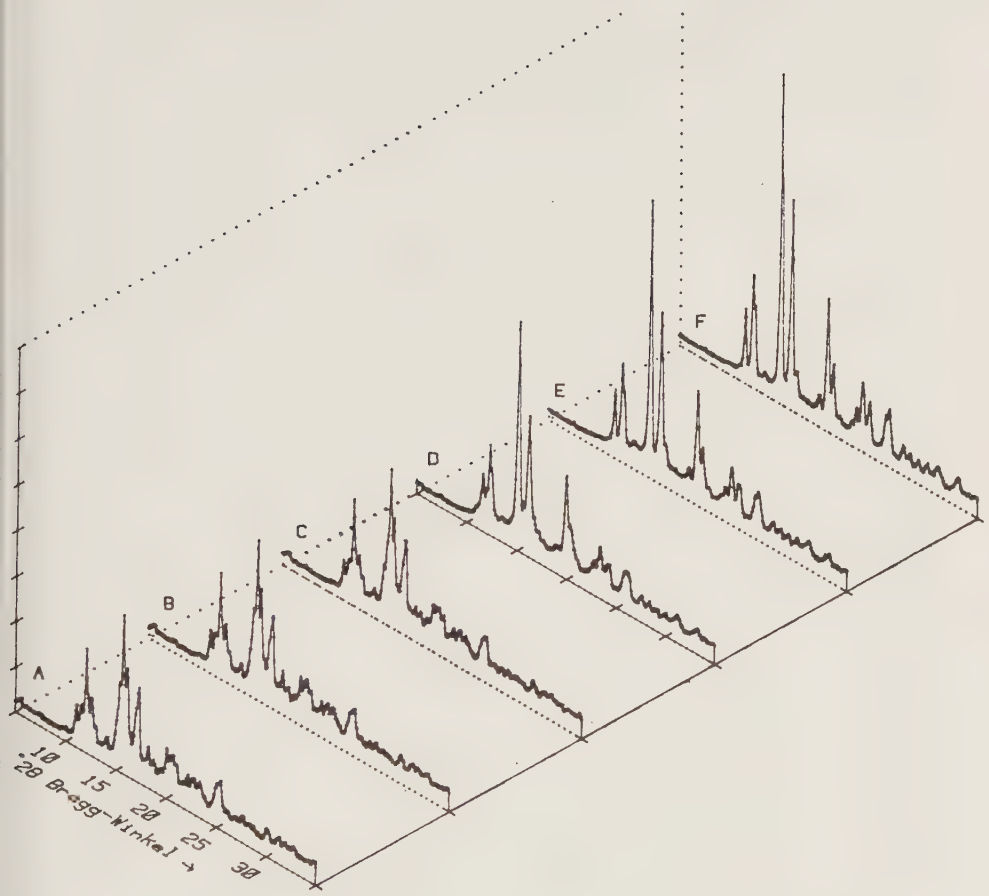


Abb. 10 Röntgendiffraktogramme von Digoxigenin während des Aufheizens bei

A) 293 K (20 °C)
B) 313 K (40 °C)
C) 343 K (70 °C)
D) 373 K (100 °C)
E) 403 K (130 °C)
F) 433 K (160 °C)

Von dieser Temperatur an weist das Röntgendiffraktogramm ein ganz anderes Peakmuster auf, was die folgende Gegenüberstellung der Röntgendiffraktogramme bei 363 K (90 °C) und 383 K (110 °C) in auffälliger Weise demonstriert.

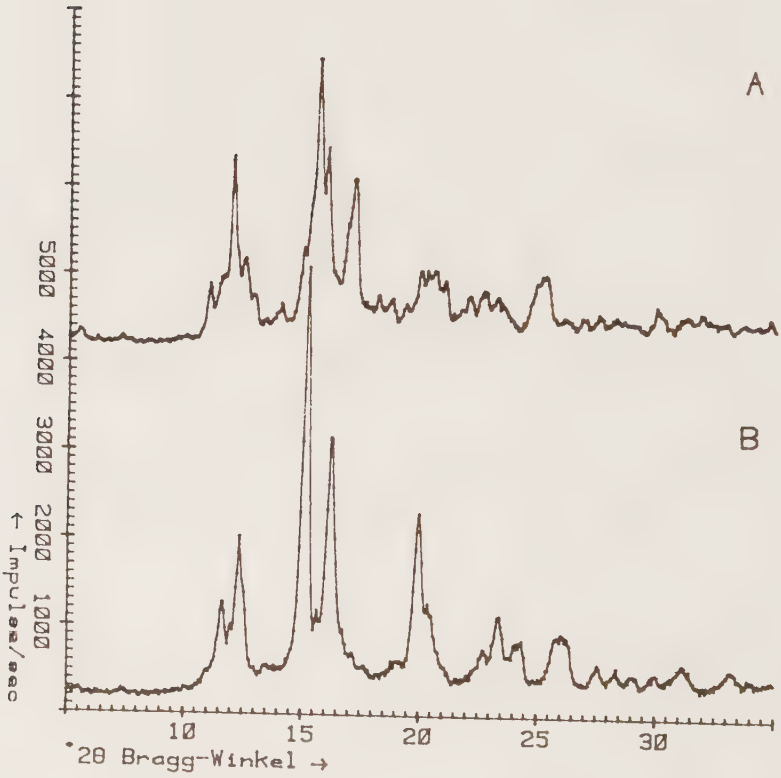


Abb. 11 Gegenüberstellung der Röntgendiffraktogramme von Digoxigenin bei
A) 363 K (90 °C) B) 383 K (110 °C)

Die einzelnen Peaks sind jetzt ausgeprägter und schärfer geworden. Des weiteren sind die Maxima vergleichbarer Peaks zu anderen Wellenlängen hin verschoben. Die folgende Tabelle stellt die Braggwinkel mit den zugehörigen Höhenverhältnissen und den entsprechenden Netzebenenabständen gegenüber.

Tabelle 7
Peakmaxima der bei 363 K (90 °C) (= A) und 383 K (110 °C) (= B) aufgenommenen Röntgendiffraktogramme

Braggwinkel 2 Θ		Abstand d (Å)		Peakverhältnis	
A	B	A	B	A	B
11,05		8,000		25,62	
12,05		7,338		67,87	
	12,4		7,131		39,8
12,55		7,047		34,14	
14,10		6,275		19,33	
	14,49		6,103		12,65
	15,29		5,786		100,00
15,65		5,657		100,00	
16,04		5,517		70,82	
	16,29		5,433		61,88
17,19		5,150		60,54	
18,25		4,856		22,30	
18,79		4,716		21,21	
20,00		4,435		30,41	
	20,04		4,424		45,15
20,29		4,370		30,44	
20,60		4,307		30,41	
21,05		4,216		27,24	
22,09		4,018		22,27	
22,74	22,74	3,905	3,905	23,95	15,07
23,30		3,814		22,02	
	23,45		3,790		22,59
	24,40		3,644		17,20
25,30		3,517		29,11	
	26,05		3,417		18,60

Es wird deutlich, daß oberhalb 373 K (100 °C) ein ganz anderes Kristallgefüge vorliegen muß als unterhalb. Aufgrund dieses Ergebnisses könnte ein Hydrat vorliegen, vor allem wenn man berücksichtigt, daß die TG-Untersuchungen einen Wassergehalt auswiesen, der unter Berücksichtigung der molaren Verhältnisse einem Mono-

hydrat entsprechen würde. Dies wird auch beim Vergleich der bei den jeweiligen Temperaturwerten ermittelten Kristallindices deutlich.

Die folgende Tabelle zeigt, daß mit steigender Temperatur auch der Kristallinitätsgrad zunimmt. Ausgehend von 0,78 bei Raumtemperatur steigt er auf 0,83 bei 373 K (100 °C) und auf 0,85 bei 433 K (160 °C). Der KI-Wert bei 293 K (20 °C) zeigt überdies, daß bei Raumtemperatur kein vollkristallines Produkt vorliegt.

Tabelle 8 Kristallinitätsgrad bei aufsteigenden Temperaturwerten:

Temperatur (°C)	K.I.
20	0,78
40	0,78
70	0,79
100	0,83
130	0,83
160	0,85

Daß diese Umwandlung aber auch reversibel ist, zeigt das folgende Röntgendiffraktogramm, das 48 Stunden nach dem Ende des Aufheizens auf 433 K (160 °C) aufgenommen wurde. Die Aufbewahrung während dieses Zeitraums erfolgte unter normalen Laborbedingungen, d.h. eine Wasseraufnahme war immer möglich.

Der ursprüngliche Ausgangszustand ist wieder hergestellt, es handelt sich also nur um einen enantiotropen Vorgang.

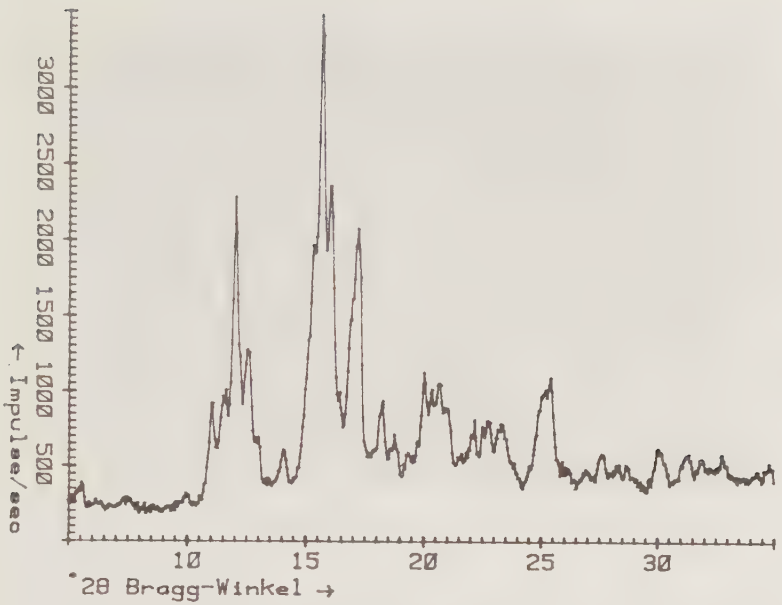


Abb. 12 Röntgendiffraktogramm von Digoxigenin, 48 Stunden nach Aufheizen auf 433 K (160 °C)

Die Röntgendiffraktometrie kann nicht als alleiniges Kriterium zur Klärung der Frage herangezogen werden, ob tatsächlich ein Hydrat vorliegt. Es muß berücksichtigt werden, daß die Probe bei dem geschilderten Versuch während einer verhältnismäßig langen Zeit der Röntgenstrahlung ausgesetzt war, die neben der Temperatureinwirkung auch Änderungen im Kristallgefüge bewirken kann. In den folgenden Abschnitten werden weitere Methoden vorgestellt, die Aussagen über die Existenz eines Hydrats zulassen. In entsprechenden Versuchsreihen soll untersucht werden, ob die durch die Röntgendiffraktometrie ermittelte Aussage haltbar ist.

3.2.4. Polarisationsmikroskopie

Nach KOFLER (82) stellt die Polarisationsheizmikroskopie, kurz PHMK, ein ausgezeichnetes Verfahren zur Erkennung verschiedener Kristallzustände dar. Veränderungen, die durch die Temperatureinwirkung bedingt sind, können am Wechsel der Form der Kristalle und an der Änderung der auftretenden Polarisationsfarben erkannt werden (184).

Für den Fall, daß man die gleiche Aufheizgeschwindigkeit wie bei der DTA wählt, lassen sich die dort beobachteten exo- und endothermen Vorgänge unter Umständen optisch nachvollziehen.

Aus diesem Grunde wurde bei den folgenden Versuchen eine Scanrate von 5 K/min eingehalten.

Ausgehend von der Starttemperatur von 298 K (25 °C) bis zum Wert von 363 K (90 °C) sind keine auffälligen Änderungen zu erkennen. Nach Überschreiten von 373 K (100 °C) müßte eigentlich eine Änderung der Kristalle zu beobachten sein, wenn die bei der Röntgendiffraktometrie beobachteten Veränderungen auf einer Dehydratation beruhen.

Erstaunlicherweise ist das aber nicht der Fall, wie die Gegenüberstellung der bei 363 K (90 °C) und bei 383 K (110 °C) aufgenommenen Bilder zeigt. Die Polarisationsfarben haben sich nicht gewandelt und auch nicht die äußere Form der Kristalle.

Letzteres kann, nach KUHNERT-BRANDSTÄTTER (2), durchaus beim Übergang von lösungsmittelhaltigen Kristallen in die lösungsmittelfreie Form beobachtet werden. Diese Erscheinung heißt dann Pseudomorphose.

Typisch für diese Erscheinung ist aber auch eine Änderung bzw. zumindest ein vorübergehendes Verschwinden der Polarisationsfarben, was aber nur in geringem Maße beobachtet werden konnte.

A) bei 363 K (90 °C) ⟷ 100 µm

B) bei 383 K (110 °C) ⟷ 100 µm

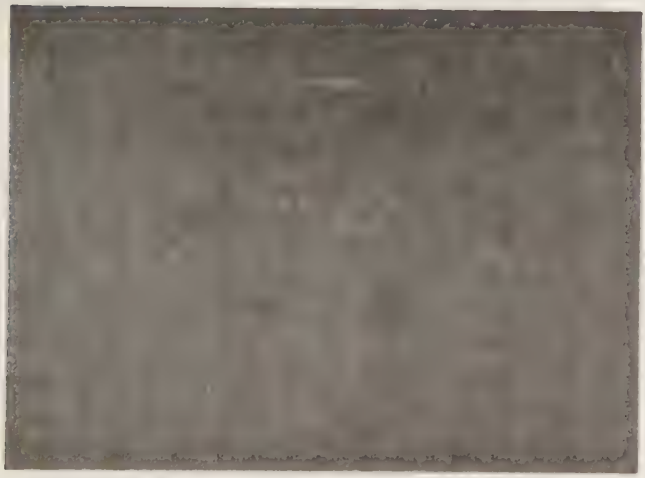
Abb. 13 Polarisationsmikroskopische Aufnahmen von in Wasser ausgefälltem Digoxigenin

Ein Verschwinden der Farben nach einer vorangegangenen Aufhellung und damit verbunden der Übergang in einzelne Tröpfchen tritt erst am Schmelzpunkt des Digoxigenins in Erscheinung, was die folgenden bei 483 K (210 °C) und 485 K (212 °C) aufgenommenen Bilder zeigen. Es wird deutlich, daß der Schmelzvorgang bei der gewählten Heizrate sehr schnell erfolgt. Bei 483 K (210 °C) sind nur vereinzelt isotrope Tröpfchen zu erkennen, bei 485 K (212 °C) jedoch sind auch die größeren Kristalle schon vollständig geschmolzen.

KUHNERT-BRANDSTÄTTER konnte neben der Pseudomorphose noch weitere Übergangstypen von Hydraten zu wasserfreien Formen beobachten, die aber auch nicht dem beim Digoxigenin festgestellten Vorgang ähneln.

Wenn die Untersuchungssubstanz in eine geeignete Flüssigkeit eingebettet wird, läßt sich die Entstehung lösungsmittelfreier Kristalle ausgezeichnet von einer anderen Umwandlung unterscheiden: beim Zerfall von Hydraten bzw. Solvaten werden nämlich schlagartig Gasblasen des Lösungsmittels frei, die als kräftige schwarz umrandete Kreise in Erscheinung treten. Aus diesem Grunde wurde der Aufheizvorgang nach einer Einbettung in Silikonöl, das nach KUHNERT-BRANDSTÄTTER für Steroide gut geeignet ist, wiederholt (18).

A) bei 483 K (210 °C) ⟵⟶ 100 µm



B) bei 485 K (212 °C) ⟵⟶ 100 µm

Abb. 14 Polarisationsmikroskopische Aufnahmen von in Wasser ausgefälltem Digoxigenin

Wie das folgende Bild, das bei 373 K (100 °C) photographiert wurde, zeigt, ist diese Erscheinung beim untersuchten Digoxigenin aber nicht aufgetreten.

Abb. 15 Polarisationsmikroskopische Aufnahme von in Silikonöl eingebettetem Digoxigenin bei 373 K (100 °C)

Das in den Kristallen enthaltene Wasser ist also nicht an einem bestimmten Punkt freigeworden, wie es für Hydrate typisch wäre, sondern scheinbar nach und nach, worauf ja auch die bereits angeführten DTA- und TG-Untersuchungen hinweisen. Dieses Verhalten entspricht dem einer Substanz, die sorbiertes Wasser enthält. Bei einer allmählichen Wasserabgabe ist nämlich keine Blasenbildung zu beobachten.

3.2.5. Gegenüberstellung der bisherigen Versuchsergebnisse

Die bis zu diesem Punkt durchgeführten thermoanalytischen Versuche führten zu keinem eindeutigen Ergebnis:

- TG- und DTA-Messungen lassen bei einer Aufheizgeschwindigkeit von 5 K/min einheitlich einen Wasserverlust im Bereich von 373 K (100 °C) erkennen. Allerdings ist der Kurvenverlauf auf keinem der erhaltenen Diagramme so prägnant, daß man direkt auf das Vorliegen eines Hydrates schließen kann.

- PHMK-Untersuchungen liefern ebenfalls keinen konkreten Hinweis auf die Existenz eines Hydrates. Da die Wasserabgabe ihr Maximum bei etwa 373 K (100 °C) erreicht, ist also durchaus die Möglichkeit gegeben, daß es sich um adsorbiertes Wasser handelt.

- RD-Analysen hingegen weisen eindeutig nach, daß unterhalb von 373 K (100 °C), also vor der Abgabe des Wassers, ein anderes Kristallgitter vorliegt als oberhalb dieser Temperatur.

Aufgrund dieser widersprüchlichen Aussagen scheint es ratsam, den direkten Einfluß erhöhter Temperatur während der Analyse auszuscheiden. Es ist ja nicht auszuschließen, daß höhere Temperaturen auch andere Vorgänge als die Dehydratation in den Digoxigeninkristallen bewirken. Durch definierte Vorbehandlung der Proben vor der thermoanalytischen Untersuchung soll ein zusätzliches Bewertungskriterium eingebracht werden.

Aus diesem Grund wird im folgenden Abschnitt der Einfluß wasserentziehender Methoden und die Auswirkung definierter Luftfeuchten auf den Wassergehalt des Digoxigenins untersucht werden. Diesen Versuchen liegt die Erfahrung zugrunde, daß der Wasserentzug bei Hydraten i.a. nur durch Temperatureinwirkung, nicht aber durch Aufbewahrung in trockener Atmosphäre erfolgt.

3.3. Untersuchung des Einflusses definierter Umgebungsfeuchtigkeit

3.3.1. Lagerung über Schwefelsäure

Um die Wirkung stark wasseranziehender Substanzen, die üblicherweise als Trockenmittel eingesetzt werden, zu untersuchen, wurden Proben des in Wasser ausgefälltem Digoxigenins in einem evakuierten Trockenschrank 24 Stunden lang über konzentrierter Schwefelsäure bei Raumtemperatur gelagert. Sofort nach der Entnahme aus dem Schrank wurden DTA-Messungen durchgeführt.

Abbildung 16 zeigt, daß das Digoxigenin kein Wasser mehr enthält, da der entsprechende Peak fehlt. Der Wasserentzug ohne Zufuhr thermischer Energie war also möglich. Die dem Trockenschrank entnommenen Proben wurden in ein dicht schließendes Schraubglas überführt und bei Raumtemperatur unter normalen Laborbedingungen gelagert. In der Folgezeit wurden nach bestimmten Zeiten Proben entnommen und einer DTA-Messung unterzogen. Die folgende Abbildung zeigt, daß Digoxigenin im Verlauf von 6 Monaten wieder seinen ursprünglichen Wassergehalt erreichte, d.h. er stieg von 0 % wieder auf 4,4 % an.

Durch die Aufbewahrung im verschlossenen Gefäß konnte der Prozeß der Wasseraufnahme so verlangsamt werden, daß er mittels DTA gut zu beobachten war. Bei Lagerung des getrockneten Digoxigenins an der Luft wird der Ausgangsgehalt nämlich binnen 24 Stunden wieder erreicht, was bei definierten Hydraten unter diesen Bedingungen normalerweise nicht eintritt.

Abb. 16 DTA-Kurven des wasserfreien Digoxigenins

Entnahme aus einem dicht verschlossenen Gefäß zu unterschiedlichen Zeiten:

A) sofort nach Entnahme aus dem Vakuum
B) nach 2 Wochen
C) nach 4 Wochen
D) nach 6 Wochen
E) nach 3 Monaten
F) nach 6 Monaten

3.3.2. Erstellung einer Sorptionsisotherme

Um die Erkenntnisse der Lagerung über H_2SO_4 auszuweiten und zu präzisieren, wurde das in Wasser ausgefällte Digoxigenin ohne vorherige Trocknung in Hygrostaten (84) mit unterschiedlicher Luftfeuchtigkeit eingebracht und dort belassen, bis sich ein Gleichgewicht zwischen dem Feuchtigkeitsgehalt der Probe und dem umgebenden Raumklima eingestellt hatte (94). Das war nach 4 Wochen der Fall.

Die in festen oder flüssigen Körpern enthaltene Feuchtigkeit kann nach der Art der Bindung als Haft-, Kapillar- oder Quellflüssigkeit bezeichnet werden. Diese Bindungen kommen ausschließlich durch Van-der-Waals'sche Anziehungskräfte zustande. Wesentlich stärkere Kräfte treten bei der sogenannten Chemisorption auf, die den Einbau von Kristallwasser in eine Substanz beschreibt.

Der Wassergehalt der einzelnen Proben wurde thermogravimetrisch ermittelt und die erhaltenen Werte in ein Diagramm eingezeichnet, das die Feuchtigkeitsbeladung bezogen auf die wasserfreie Substanz in Abhängigkeit von der relativen Luftfeuchtigkeit aufzeigt. Es resultierte die für Digoxigenin bei 293 K (20 ^{o}C) geltende Sorptionsisotherme, die in der folgenden Abbildung dargestellt ist (85).

Man erkennt, daß der Wassergehalt des Digoxigenins von 0 % ausgehend bis etwa 35 % r.F. deutlich zunimmt, um dann bis etwa 80 % r.F. nur noch geringfügig anzusteigen. Oberhalb dieses Wertes nimmt der Feuchtigkeitsgehalt wieder stark zu.

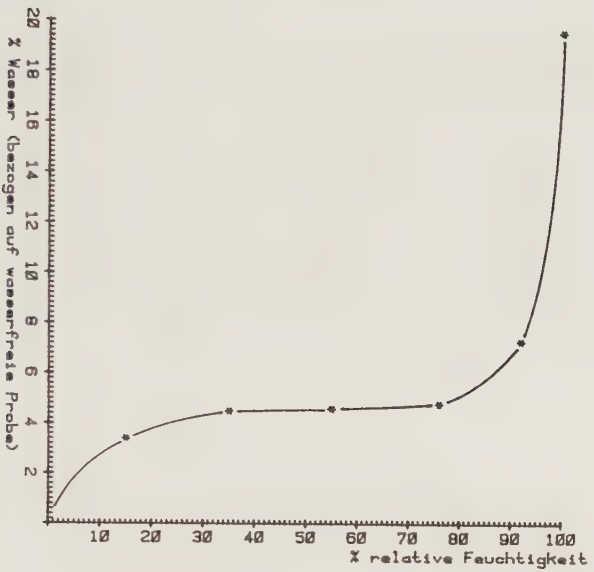


Abb. 17 Sorptionsisotherme von Digoxigenin bei 293 K (20 °C)

Es konnte aber nicht beobachtet werden, daß die Substanz bei hoher Umgebungsfeuchtigkeit zerfließt.

Nach KNEULE (85) kann der Verlauf der Sorptionsisotherme folgendermaßen interpretiert werden:

Die Sorptionsisotherme gliedert sich - wie schon beschrieben - in 2 ausgeprägte Abschnitte. Im Bereich niedriger Gleichgewichtsdampfdrücke handelt es sich ausschließlich um den Vorgang der Adsorption. Der adsorbierte Dampf wird an der inneren Oberfläche des Adsorbens nur soweit verdichtet, daß sich noch keine Flüssigkeitshaut bildet. Im Gebiet höherer Werte ist für die Feuchtigkeitsbindung ein anderer Vorgang maßgeblich, nämlich die sogenannte K a p i l l a r k o n d e n s a t i o n . An Stelle der nur wenige Molekülagen dicken Schicht verdichteten Dampfes bildet sich eine Flüssigkeitshaut, deren Dicke mit steigendem Wasserdampfdruck zunimmt. Schließlich ziehen die in den Substanzpartikeln enthaltenen Kapillaren Wasserdampf an, bis ein Gleichgewichtszustand erreicht ist.

Die Ergebnisse der Lagerversuche bei unterschiedlicher umgebender Luftfeuchtigkeit lassen sich also dahingehend zusammenfassen, daß Digoxigenin ein Hydrat ausbildet.

Der typische Verlauf der Sorptionsisotherme läßt nur diesen Schluß zu. Der über einen weiten Bereich konstante Wassergehalt von 4,4 % beinhaltet - bezogen auf die relative Molmasse des Digoxigenins von 390,52 -, daß ein Monohydrat vorliegt. Bemerkenswert ist allerdings, daß das Digoxigeninhydrat in Gegenwart von konzentrierter Schwefelsäure sein Kristallwasser vollständig abgibt.

3.4. Untersuchungen unter isothermen Bedingungen

3.4.1. Thermogravimetrie

Bei den vorgenannten Versuchsbedingungen (vgl. 3.3., S. 42) hatte sich gezeigt, daß Digoxigenin in Abhängigkeit von der umgebenden Luftfeuchtigkeit unterschiedliche Mengen Wasser anlagert. Diese Versuche waren bei Raumtemperatur durchgeführt worden, um thermische Einflüsse ausschließen zu können.

Aus der DTA-Kurve, Abb. 9, und der TG-Kurve, Abb. 6, (vgl. 2.3., S. 14) ist ersichtlich, daß Digoxigenin bereits ab einer Heiztemperatur von 318 K (45 ^{o}C) beginnt, das enthaltene Wasser abzugeben.

Dieser Temperaturwert liegt noch deutlich unter dem Wert, bei dem röntgendiffraktometrisch Änderungen der Kristallstruktur festgestellt wurden (vgl. 3.2.3., S. 30), so daß die Wahrscheinlichkeit gering ist, daß dieser Temperaturwert die beschriebene Umwandlung ermöglicht.

Im Folgenden soll nun untersucht werden, was passiert, wenn bei normaler Feuchte (ca. 50 % r.F.) konstant 318 K (45 ^{o}C) auf die Digoxigeninproben einwirken.

Das genaueste Ergebnis versprach eine thermogravimetrische Be-

stimmung unter isothermen Bedingungen. So ließ sich der Wasserverlust des Digoxigenins in Abhängigkeit von der Einwirkungsdauer der genannten Temperatur darstellen.

Abbildung 18 veranschaulicht, daß sich das Gewicht der Digoxigeninprobe während eines Zeitraumes von 23 Stunden kontinuierlich verringert und dann konstant bleibt. Der gemessene Gewichtsverlust von 4,2 % entspricht, bezogen auf die Einwaage, etwa dem unter 2.3., S. 14, ermittelten durchschnittlichen Wassergehalt von 4,4 %.

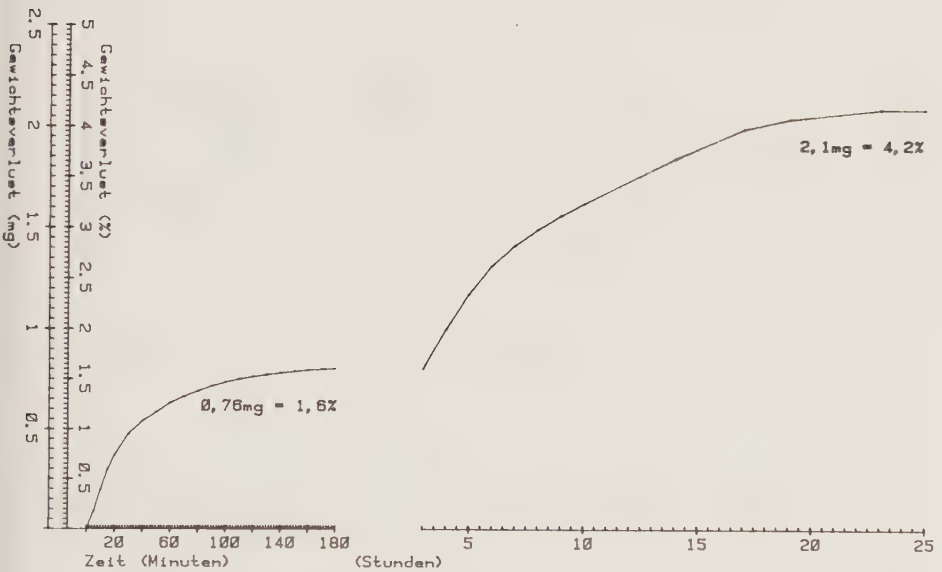


Abb. 18 Wasserverlust von Digoxigenin bei konstant 318 K (45 °C)

In der folgenden Tabelle sind die Versuchsparameter aufgeführt:

Tabelle 9 Versuchsparameter

Einwaage	:	49,8 mg
Temperatur	:	318 K (45 °C)
Versuchsdauer	:	25 h
Gewichtsverlust	:	2,1 mg ≙ 4,2 %

3.4.2. Röntgendiffraktometrie

Unter 3.4.1., S. 46, wurde festgestellt, daß eine Digoxigeninmenge von rund 50 mg in 24 Stunden das gesamte enthaltene Wasser bei einer Temperatur von 318 K (45 °C) abgibt. Aufgrund dieses Resultates stellte sich die Frage, ob sich der Kristallzustand während dieses Vorgangs in der gleichen Weise ändert, wie bei den röntgendiffraktometrischen Untersuchungen, die bei steigenden Temperaturen durchgeführt wurden (vgl. 3.2.3., S. 30).

Eine Digoxigeninmenge von 100 mg wurde im Röntgendiffraktometer bei konstant 318 K (45 °C) gelagert und nach regelmäßigen Zeitabschnitten Diffraktogramme aufgenommen.

Die folgende Abbildung 19A, S. 49, zeigt das Röntgendiffraktogramm, das am Anfang der Temperaturperiode aufgenommen wurde. Der KI beträgt 0,80 und der Peak mit der größten Intensität liegt bei einem Bragg-Winkel von 15,65° 2Θ, was einem Netzebenenabstand von 5,657 Å entspricht.

Nach 24 Stunden war, wie Abbildung 19B, S. 49, zeigt, praktisch keine Änderung im Röntgendiffraktogramm aufgetreten. Der KI betrug jetzt 0,77 und der höchste Peak lag bei einem Winkel von 15,60° 2Θ.

Es kann davon ausgegangen werden, daß es sich nach diesem Zeitraum um das Diffraktogramm des wasserfreien Digoxigenins handelt. Überraschenderweise führt der Wasserverlust unter den gewählten Bedingungen aber nicht zu einer Änderung des Peakmusters.

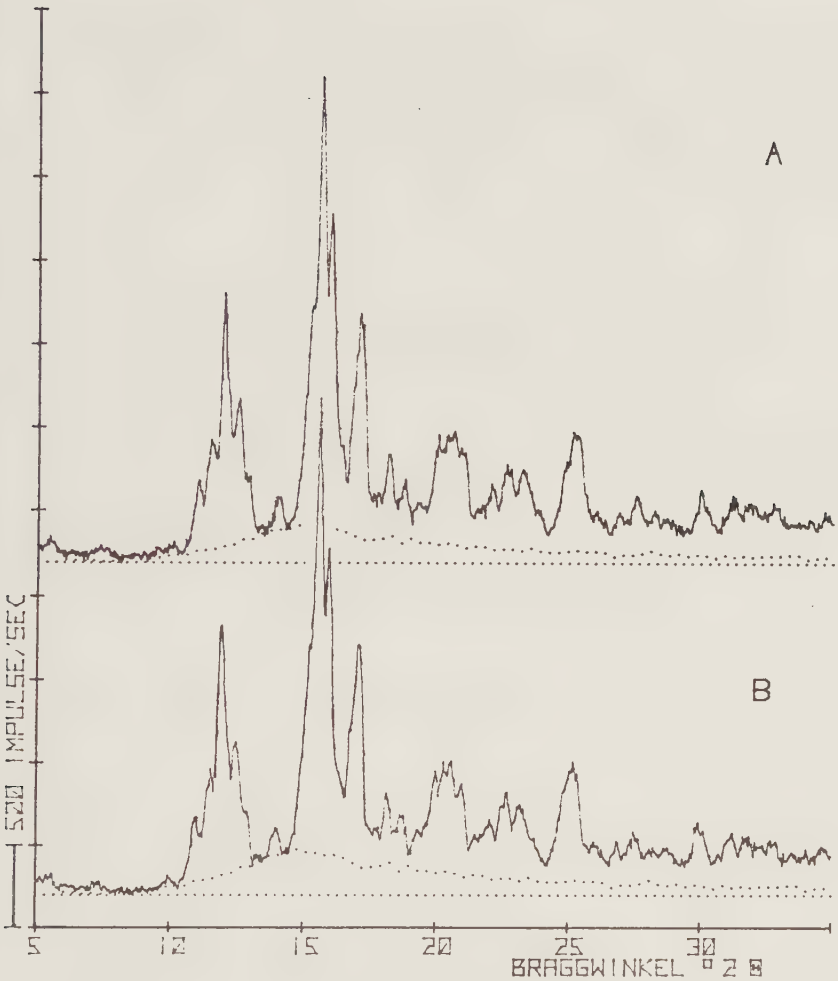


Abb. 19 Röntgendiffraktogramme von Digoxigenin bei konstant 318 K (45 °C)

A) zu Beginn der Heizperiode

B) nach 24 Stunden

Eine solche Änderung war, wie oben angesprochen, während der RD-Untersuchungen bei erhöhten Temperaturen beobachtet worden und als deutlicher Hinweis für das Vorliegen eines Hydrats interpretiert worden. An dieser Stelle muß aber dagegen gehalten werden, daß es auch Hydrate gibt, die ihren Gitteraufbau trotz Kristallwasserverlust nicht ändern (92,93).

3.5. IR-Untersuchungen des wasserfreien und des wasserhaltigen Digoxigenins

Die bisher in diesem Abschnitt angeführten Versuche zeigten, daß Digoxigenin das enthaltene Wasser auch unter milden Bedingungen abgibt, andererseits aus der Umgebungsluft leicht wieder Wasser anlagert, wenn diese Bedingungen aufgehoben wurden. Dieses Verhalten läßt eigentlich nicht auf die Existenz eines Hydrates schliessen. Auf der anderen Seite konnte eine für ein Hydrat charakteristische Sorptionsisotherme festgestellt werden (vgl. 3.3.2., S. 44).

Aus diesem Grund wurde als weitere Methode die IR-Spektroskopie herangezogen. Allgemein können hierbei folgende Beobachtungen angestellt werden:

Bei den Steroiden sind durch die Anwesenheit von OH-Gruppen die Aussichten für spektrale Unterschiede infolge Wasserstoffbrückenbindung sehr groß.

Ein weiterer Vorteil besteht darin, daß die Unterscheidung zwischen Solvat und Nichtsolvat relativ leicht möglich ist, weil in den Spektren der Solvate häufig zusätzliche Lösungsmittelbanden auftreten, welche die Identifizierung des Lösungsmittels ermöglichen (15).

Am schwierigsten ist die Identifizierung von Wasser als Lösungsmittel, da der Anteil bei Steroiden oftmals so niedrig ist, daß er unter der IR-spektroskopischen Erfassungsgrenze liegt (63).

Andererseits kann es bei der Präparation der KBr-Preßlinge zur Hydratisierung der Untersuchungssubstanz kommen, wie die Beispiele Tilidin-Hydrochlorid (89) und Glymidin-Natrium (90) beweisen. Aus diesem Grund muß darauf geachtet werden, daß das verwendete KBr völlig wasserfrei ist. Ein Erwärmen der Preßwerkzeuge auf ca. 353 K (80 ^{o}C) ist bei einer wasserfreien Präparation sehr hilfreich (63).

Im vorliegenden Fall wurden nun eine Probe, die ca. 30 Minuten bei 373 K (100 ^{o}C) getempert worden war, und eine Probe, die 5 Tage lang im Vakuum in Anwesenheit von H_2SO_4 conc. gelagert worden war, untersucht. Zum Vergleich diente unbehandeltes Digoxigenin, das gemäß 3.1., S. 26, gewonnen worden war.

Der Einbau von Wasser oder auch eines anderen Lösungsmittels in eine Substanz hat zur Folge, daß sich das Kristallgitter ändert. Wenn diese Änderungen in der unmittelbaren Umgebung IR-aktiver Stellen der Moleküle passieren, führt dies zu Verschiebungen im IR-Spektrum der betreffenden Substanz (63). Das gilt insbesondere für die Bande bei etwa 1750 cm^{-1}, die den α,β-ungesättigten Lactonring repräsentiert, weil an dieser funktionellen Gruppe am ehesten mit einer Wasserstoffbrückenbindung gerechnet werden muß (91).

Beim Vergleich der 3 Spektren (vgl. Abb. 20, S. 52) der wasserhaltigen mit den wasserfreien Proben ist aber keine Verschiebung von Banden zu erkennen, so daß davon ausgegangen werden kann, daß bei den 3 Proben identische Kristallgitter vorliegen.

Dieses Ergebnis zeigt auch, daß bezüglich der Methoden, mittels derer dem Digoxigenin das Wasser entzogen wurde, keine Unterschiede beim resultierenden Produkt zu verzeichnen sind.

Das Spektrum des wasserhaltigen Digoxigenins weist erwartungsgemäß noch die Wasserbande bei 3600 cm^{-1} auf. Sie ist - wie oben schon angedeutet - nur schwach zu erkennen, weil sie fast völlig von der Hydroxylbande bei 3400 cm^{-1} überlagert wird.

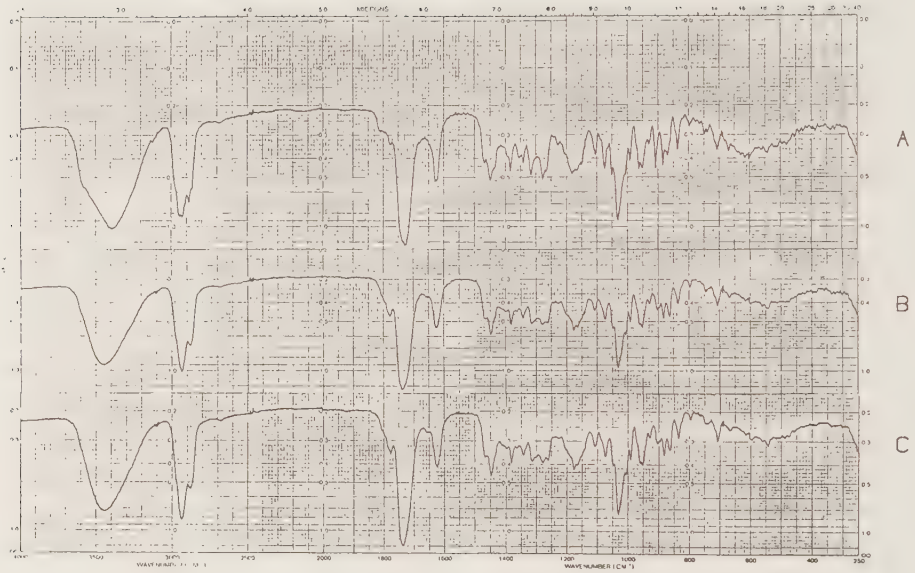


Abb. 20 IR-Spektren von wasserhaltigem und wasserfreiem Digoxigenin
A) nach Ausfällung in Wasser
B) nach Trocknung über H_2SO_4 im Vakuum
C) nach Trocknung bei 373 K (100 °C)

Auch diese Ergebnisse liefern keine eindeutige Aussage. Bandenverschiebungen, die häufig beim Vergleich von Hydrat mit Anhydrat beobachtet werden können, treten hier nicht auf, so daß auf das Vorliegen von sorbiertem Wasser geschlossen werden kann. Andererseits wird die Existenz eines Steroidhydrats, wie schon erwähnt, mittels IR manchmal nicht erkannt, wie KUHNERT-BRANDSTÄTTER am Beispiel des Cortisonacetats zeigen konnte (2).

Die IR-Untersuchungen stützen lediglich die Beobachtung, wonach

Digoxigenin beim Wasserentzug unter milden Bedingungen seine Kristallstruktur nicht ändert.

Die Klärung der Frage, ob ein Hydrat vorliegt, soll im folgenden Abschnitt unter Abwägung der Aussagekraft der verschiedenen Versuchsergebnisse erfolgen.

3.6. Wertung der Ergebnisse und Schlußbetrachtung

Nach Ausfällung der drei Digoxigeninmuster in Wasser erhält man ein einheitliches Produkt, was am Übereinstimmen der DTA-Kurven deutlich wird. Bei der Wasserbestimmung nach Karl Fischer ergibt sich ein Gehalt von etwa 4,5 %.

Wie unter 2.2., S. 14, und 2.3., S. 14, erwähnt, sind in der Literatur nur widersprüchliche Angaben zum Wassergehalt und zur Art der Bindung zu finden. Deshalb wurde diese Fragestellung mit verschiedenen Verfahren untersucht. Die Resultate sind in Tabelle 10, S. 54, zusammengefaßt.

Thermoanalytische Verfahren wie DTA und TG zeigen, daß das enthaltene Wasser beim Aufheizen kontinuierlich abgegeben wird, was am jeweils flach abfallenden Kurvenverlauf deutlich wird. Nach Überschreiten des Maximums bei etwa 373 K (100 °C) bilden die Kurven nach der vollständigen Wasserabgabe einen deutlichen Knick aus. Der erste Teil der Kurven weist also eher auf die Abgabe sorbierten Wassers hin, der zweite ist typisch für das Vorliegen eines Hydrats.

Digoxigenin zeigt beim Aufheizen keine Änderung der Kristallform und der Polarisationsfarben unter dem Polarisationsmikroskop. Bei der Einbettung in Silikonöl sind im Bereich von 373 K (100 °C) keine Dampfblasen zu erkennen. Diese Beobachtungen wie auch die im Folgenden dargestellten weisen auf sorbiertes Wasser hin:

Tabelle 10 Darstellung der Versuchsergebnisse aus Kapitel 3

Methode	Ergebnis	Hydrat	Zuordnung nicht möglich	sorbiertes Wasser
DTA	endothermer Peak bei 373 K (100 °C)		+	
	abfallender Kurvenast sehr flach			+
	ansteigender Kurvenast steil	+		
TG	Wendepunkt bei etwa 373 K (100 °C)		+	
	Wassergehalt 4,4 %		+	
	abfallender Kurvenast sehr flach			+
	stufenähnliches Kurvenende	+		
RD bei steigenden Temperaturen	oberhalb 373 K (100 °C) anderes Beugungsmuster als unterhalb	+		
PHMK	keine Änderung der Kristallform und der Polarisationsfarben, keine Dampfblasen bei Einbettung in Silikonöl			+
Lagerung über H_2SO_4 conc.	vollständiger Wasserentzug			+
Sorptionsisotherme	Plateau im Bereich 30 - 80 % r.F. bei 4,4 % Wassergehalt (≙ mol. Verhältnis 1:1 Digoxigenin-Wasser)	++		
TG isotherm (318 K = 45 °C)	vollständiger Wasserverlust nach 24 Stunden			+
RD isotherm (318 K = 45 °C)	kein anderes Peakmuster nach 24 Stunden trotz Wasserverlust		+	
IR	keine Bandenverschiebungen beim Vergleich der wasserfreien mit der wasserhaltigen Substanz		+	

Bei der Lagerung über konzentrierter Schwefelsäure wird das enthaltene Wasser vollständig abgegeben und nach Entfernung des Trokkenmittels schnell wieder aufgenommen. Auch eine thermogravimetrische Bestimmung bei konstant 318 K (45 °C) zeigt eine vollständige Wasserabgabe nach 24 Stunden. Normalerweise wird Hydratwasser nicht bei Temperaturen freigesetzt, die deutlich unter der thermoanalytisch ermittelten Abgabetemperatur liegen. IR-Spektren des wasserfreien und des wasserhaltigen Digoxigenins weisen keine signifikanten Unterschiede auf.

Ein widersprüchliches Ergebnis erbringen jedoch RD-Messungen. Unter isothermen Bedingungen, d.h. bei einer konstanten Temperatur von 318 K (45 °C), liegt nach 24 Stunden, wenn das enthaltene Wasser entfernt ist, das gleiche Beugungsmuster vor wie am Anfang der Bestimmung. Beim Aufheizen auf Temperaturen von über 373 K (100 °C) hingegen ändert sich das Peakmuster deutlich, was auf eine Änderung des Kristallgitters schließen läßt.

Die einzige eindeutige Aussage dagegen macht die Sorptionsisotherme. Im Bereich von etwa 35 % r.F. bis 80 % r.F. ist der Wassergehalt praktisch konstant. Er beträgt 4,4 %, was einem molaren Verhältnis von 1 : 1 (Digoxigenin - Wasser) entspricht.

Digoxigenin liegt nach der Ausfällung in Wasser folglich als Monohydrat vor. Das enthaltene Wasser kann untypischerweise aber unter milden Bedingungen entfernt bzw. eingelagert werden. Eine Modifikationsumwandlung findet hierbei nicht statt. Die beobachtete Änderung des Röntgenbeugungsmusters bei steigenden Temperaturen muß auf die bei diesem Versuch herrschenden langdauernden Strahlungs- und Temperatureinflüsse zurückgeführt werden.

Die thermodynamische Stabilität des Digoxigenin-Monohydrats ist nun Gegenstand der folgenden Kapitel, die sich mit Amorphisierung und Polymorphieuntersuchungen befassen.

4. Das amorphe Digoxigenin

In den vorangegangenen Abschnitten standen ausschließlich Eigenschaften des kristallinen Digoxigenins zur Diskussion. Es interessierte nun, ob es auch möglich ist, Digoxigenin in den amorphen Zustand zu überführen.

Als potentiell geeignete Methoden dieses Ziel zu erreichen könnten geeignet sein:

- Sprühtrocknung
- Rotationsverdampfung oder
- Tribomechanische Behandlung (Mahlung).

Da das erstgenannte Verfahren aufgrund der Erfahrungen unseres Arbeitskreises am ehesten eine vollständige Amorphisierung der Substanz erwarten ließ, sollten entsprechende Versuche vorangestellt werden, um die Resultate der anderen genannten Verfahren besser vergleichen zu können.

4.1. Amorphisierung durch Sprühtrocknung

4.1.1. Allgemeine Bemerkungen zur Sprühtrocknung

Bei der Oberführung in den amorphen Zustand mittels Sprühtrocknung sind substanzspezifische Eigenschaften zu beachten.

Während sich Glykoside wie Digitoxin (47) und Digoxin (21) leicht in einen stabilen amorphen Zustand bringen lassen, gelingt dies bei vielen Steroiden, zu denen auch Digoxigenin gerechnet wird, nur teilweise, was NÜRNBERG am Beispiel des Prednisolonacetats zeigen konnte. Erst durch den Zusatz stabilisierender Kolloide läßt sich in diesen Fällen der röntgenamorphe Zustand erreichen (47).

Ein Zusatz von Kolloiden ist ebenfalls angezeigt, wenn es, wie von KOHL an 9-α-Fluprednyliden-21-acetat beobachtet (95), zu einer raschen Rekristallisation der ursprünglich vollamorphen Substanz kommt. Manche Wirkstoffe fallen auch unmittelbar nach der Sprühtrocknung kristallin an, was bedeutet, daß sie überhaupt nicht amorphisiert werden können. HOPP konnte dies am Beispiel des Paracetamols demonstrieren (96).

Die Amorphisierung von Wirkstoffen ist besonders dann sinnvoll, wenn diese schwer wasserlöslich sind. Derartige Substanzen sind zur Ausbildung übersättigter Lösungen befähigt. So lassen sich bei Herzglykosiden nach wenigen Minuten Konzentrationen erreichen, die um den Faktor 10 höher sind als die Sättigungslöslichkeit der kristallinen Form. Damit verbunden ist in diesen Fällen auch eine Erhöhung der Lösungsgeschwindigkeit (97,98). Dies ist aus biopharmazeutischer Sicht wichtig, da sich so eventuell Dosisreduzierungen bei gleicher therapeutischer Wirksamkeit erzielen lassen, wie im Falle des Griseofulvins nachgewiesen wurde (103).

Außer diesem Vorteil sind aber auch noch andere Aspekte zu berücksichtigen: Herzglykoside und ihre Derivate sowie die chemisch verwandten Corticoide werden in sehr niedriger Dosierung therapeutisch angewendet, so daß indifferente Hilfsstoffe in zum Teil beträchtlicher Menge, bezogen auf die Wirkstoffmenge, zugesetzt werden müssen. Nur so können diese Wirkstoffe verfahrenstechnisch beherrscht werden und die zu fordernde Dosierungsgenauigkeit gewährleistet werden.

Verwendet man als Hilfsstoff Kolloide vom Typ der Methylcellulose, so können die mitunter nur temporär entstehenden übersättigten Lösungen im Sinne einer Kristallisationsinhibition stabilisiert werden (97).

Ein weiterer Vorteil besteht in der besseren Verarbeitungsfähigkeit bei der Herstellung von Preßmassen, die niedrig dosierte Arzneistoffe enthalten.

Die Sprühtrocknung als Methode bei der galenischen Optimierung ist darüber hinaus Gegenstand der zitierten Übersichtsarbeiten (99-102).

Im folgenden Abschnitt soll nun auf die Sprühtrocknung von Digoxigenin eingegangen werden.

4.1.2. Sprühtrocknung von Digoxigenin

Bei allen Sprühtrocknungsversuchen wurde das unter 3.1., S. 26, beschriebene Hydrat eingesetzt. Für die Durchführung standen zwei unterschiedliche, in unserem Arbeitskreis erprobte, Möglichkeiten zur Auswahl, die im Folgenden kurz vorgestellt werden sollen.

- Versprühen einer homogenen Lösung:

  In diesem Fall wird die kristalline Ausgangssubstanz in einer Mischung aus 7 Teilen Chloroform und 3 Teilen Methanol gelöst und durch eine Zweistoffdüse in die Trockenkammer des Trockners eingesprüht. Der Zusatz von Chloroform erfolgt hier zur Herabsetzung der Explosionsgefahr durch Methanol.

- Versprühen von zwei Partiallösungen:

  Der Einsatz organischer Lösungsmittel, vor allem der chlorierten Kohlenwasserstoffe, ist in jüngster Zeit wegen der zum Teil erheblichen Toxizität prohibitiv geworden. Aus diesem Grunde wurde versucht, ein Verfahren zu finden, bei dem auf den Zusatz von Chloroform verzichtet werden konnte und bei dem auch eine Reduzierung des organischen Lösungsmittelanteils überhaupt erreicht werden konnte. DÖLLE gelang dies durch den Einsatz des im Folgenden genannten Verfahrens (21):

  Die kristalline Ausgangssubstanz wird in Methanol gelöst und durch den inneren Kanal einer Dreistoffdüse in die Trockenkammer eingesprüht. Durch den mittleren Kanal wird Wasser gesprüht, um eine Explosion des Methanols von vorneherein auszuschließen. DÖLLE wählte aus diesem Grunde noch ein Wasser/-Methanol-Verhältnis von 9 : 1. Es stellte sich aber heraus, daß ein Verhältnis von 3 : 1 für den genannten Zweck völlig aus-

reichend war. Durch den äußeren Kanal wird, wie im Falle der Zweistoffdüse, Druckluft geleitet, um den Flüssigkeitsfaden zu zerstäuben.

Der Einsatz der Dreistoffdüse verhindert, daß die schlecht wasserlösliche Ausgangssubstanz vorzeitig kristallin ausfällt, was einerseits die Kanäle verstopfen würde und andererseits die vollständige Amorphisierung verhindern könnte, da diese nur durch die Trocknung vollständig gelöster Substanz möglich ist.

Es sollten beide Verfahren angewendet und untersucht werden, ob sich die anfallenden Produkte hinsichtlich ihrer physikalischen Eigenschaften unterscheiden.

Die folgende Tabelle stellt die Sprühparameter gegenüber.

Tabelle 11 Zusammenfassung der Sprühparameter für die Herstellung von amorphem Digoxigenin

Sprühtrockner	Büchi 190	Mini Spray HO
Düsentyp	Zweistoff	Dreistoff
Lösungsmittel	$CHCl_3/CH_3OH$ 7:3	CH_3OH/H_2O 1:3
Konz. der Lsg. [%G/G]	1	4*
Pumprate [ml/min]	15	10
Eingangstemperatur [K(^oC)]	403 (130)	403 (130)
Ausgangstemperatur [K(^oC)]	363 (90)	373 (100)
Düsendruck [Pa]	-	$1{,}3 \times 10^5$
Luftdurchsatz [Normliter/h]	70	-
Vakuum [mm H_2O]	-	50

* bezogen auf CH_3OH

In beiden Fällen wurden einwandfreie Produkte gewonnen, die sich rein äußerlich in keinem Punkt unterschieden. Mikroskopisch waren die für ein Sprühprodukt typischen Kugeln mit einem Durchmesser von etwa 5 µm zu beobachten. Die Ausbeute lag unabhängig vom Verfahren zwischen 60 und 65 %.

Im nächsten Abschnitt wird auf weitere galenisch relevante Eigenschaften der Sprühprodukte eingegangen.

4.1.3. Untersuchung der Sprühtrocknungsprodukte

Unmittelbar nach der Herstellung wurden Röntgendiffraktogramme von beiden Produkten angefertigt. Dabei wurde festgestellt, daß sie einen vollamorphen Charakter (Bragg-Winkel 5^{o} - 35^{o} 2θ) aufweisen, der am "amorphen Halo" in den folgenden Abbildungen erkennbar ist.

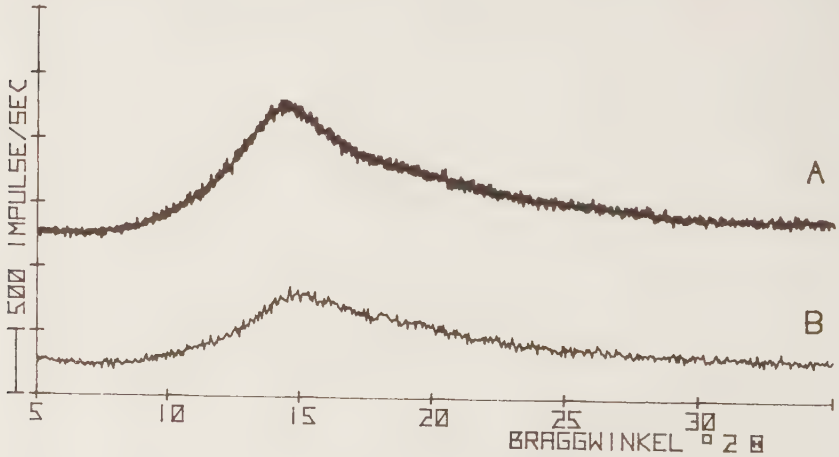
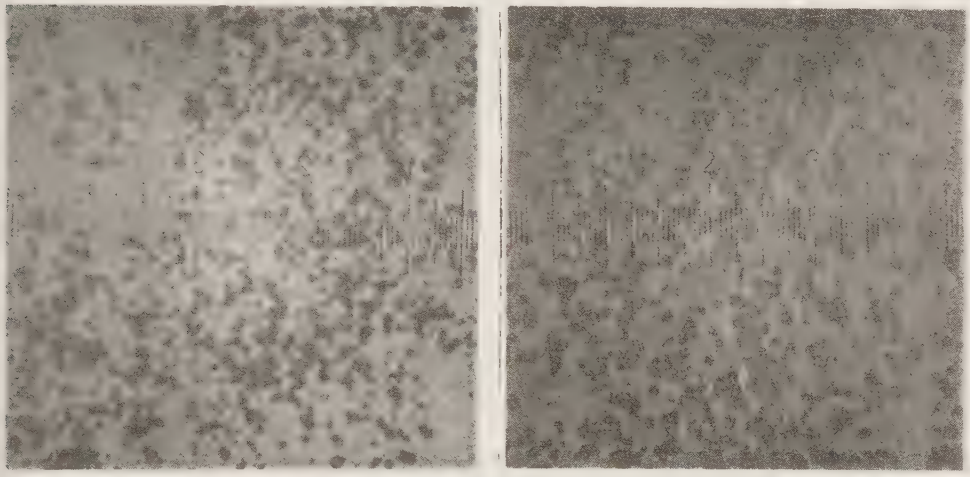


Abb. 21 Röntgendiffraktogramme von sprühgetrocknetem Digoxigenin
A) Dreistoffdüsentechnik
B) Zweistoffdüsentechnik

Unterstützt wird diese Beobachtung durch polarisationsmikroskopische Untersuchungen. Auf den folgenden Abbildungen sind ausschließlich kugelförmige isotrope Partikel zu erkennen.



A) B)

Abb. 22 Polarisationsmikroskopische Aufnahmen von sprühgetrocknetem Digoxigenin

A) Dreistoffdüsentechnik 10 µm

B) Zweistoffdüsentechnik 10 µm

Die folgende Abbildung zeigt DTA-Kurven, die sofort im Anschluß an die Sprühtrocknung aufgezeichnet wurden.

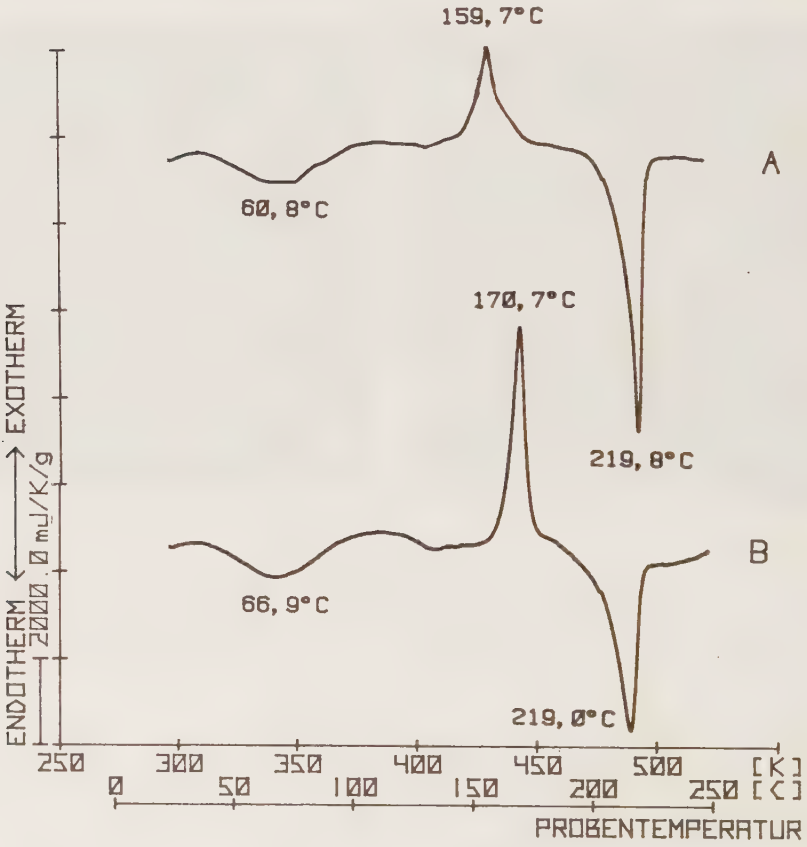


Abb. 23 DTA-Kurven von sprühgetrocknetem Digoxigenin
A) Dreistoffdüsentechnik
B) Zweistoffdüsentechnik

Der Verlauf, der sich sehr ähnelt, weist folgende Merkmale auf:

Im Bereich von ca. 333 K (60 °C) tritt eine bauchförmige Auslenkung auf. Die gleiche endotherme Auslenkung wurde auch von DÖLLE bei sprühgetrocknetem Digoxin festgestellt und auf Lösungsmittelreste zurückgeführt (2). Durch Rekristallisation der amorphen Substanz kommt es zu einer exothermen Reaktion bei etwa 423 K (160 °C) bzw. 433 K (170 °C). Im Anschluß daran schmelzen die Substanzen bei etwa 493 K (220 °C), was sich als endothermer Vorgang äußert. Beide Vorgänge konnten mittels Polarisationsheizmikroskopie eindeutig zugeordnet werden.

In der folgenden Tabelle sind die genauen Zahlenwerte der DTA-Untersuchungen aufgelistet:

Tabelle 12 Ergebnisse der DTA-Untersuchungen

	aus CH_3OH/H_2O 1 : 3 mittels Dreistoffdüse	aus $CHCl_3/CH_3OH$ 7 : 3 mittels Zweistoffdüse
endotherme Peaks	333,8 K (60,8 °C)	339,9 K (66,9 °C)
	492,8 K (219,8 °C)	492,5 K (219,0 °C)
exothermer Peak	431,7 K (159,7 °C)	443,7 K (170,7 °C)

Aufgrund der angeführten Ergebnisse läßt sich zusammenfassend feststellen, daß die zwei Sprühmethoden zu einem - bezüglich des Amorphitätsgrades - gleichen Produkt führen.

Bemerkenswert ist allerdings der Befund, daß der endotherme Schmelzprozeß erst bei 493 K (220 °C) stattfindet. Das kristalline Ausgangsprodukt weist bei gleichen Aufheizbedingungen (5K/min) einen entsprechenden Peak schon bei 483 K (210 °C) auf.

Da an dieser Stelle noch keine Erklärung für dieses Verhalten gegeben werden konnte, mußte es Ausgangspunkt für weitere spezifische Versuche sein.

4.1.4. Untersuchung der gelagerten Sprühprodukte mittels Röntgendiffraktometrie

Die bei Raumtemperatur in verschlossenen Schraubgläsern gelagerten Sprühprodukte wurden in bestimmten Zeitabständen einer röntgendiffraktometrischen Untersuchung unterworfen, um den jeweiligen Grad einer eventuell auftretenden Kristallisation zu untersuchen.

In der Tat konnte festgestellt werden, daß nach einigen Wochen schwache Interferenzen auftraten und der Kristallinitätsindex bei weiterer Lagerung anstieg.

Abbildung 24, S. 65, die sechs zu verschiedenen Zeiten aufgenommene Röntgendiffraktogramme zeigt, macht diesen Rekristallisationsvorgang anschaulich.

Aus der nachstehenden Tabelle kann ersehen werden, daß der Rekristallisationsvorgang auch nach 4 Jahren nicht vollständig abgeschlossen war. An der Beobachtung von DÖLLE (21), daß amorphes Digoxigenin innerhalb von 4 Wochen rekristallisiert, kann deshalb nicht mehr festgehalten werden.

Tabelle 13 Rekristallisation von sprühgetrocknetem Digoxigenin in Abhängigkeit von der Lagerdauer

Lagerdauer	KI
nach Herstellung	0,00
3 Wochen	0,11
3 Monate	0,30
6 Monate	0,53
1 Jahr	0,65
4 Jahre	0,74

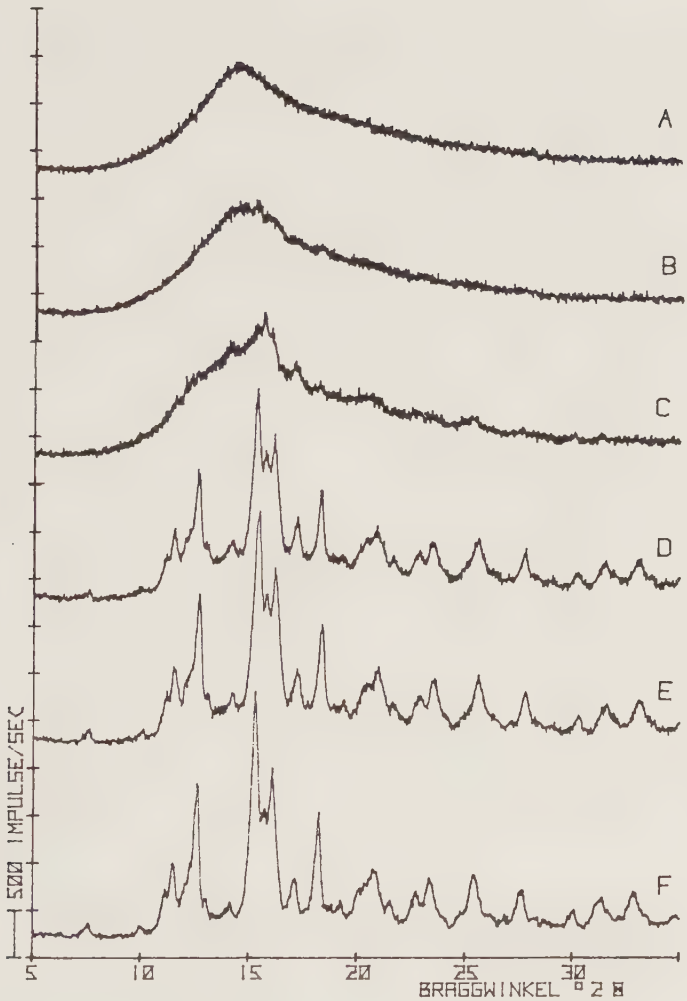


Abb. 24 Röntgendiffraktogramme von sprühgetrocknetem Digoxigenin nach verschiedenen Lagerzeiten

A) nach Herstellung
B) nach 3 Wochen
C) nach 3 Monaten
D) nach 6 Monaten
E) nach 1 Jahr
F) nach 4 Jahren

Die Zunahme des KI wird in der folgenden graphischen Darstellung deutlich:

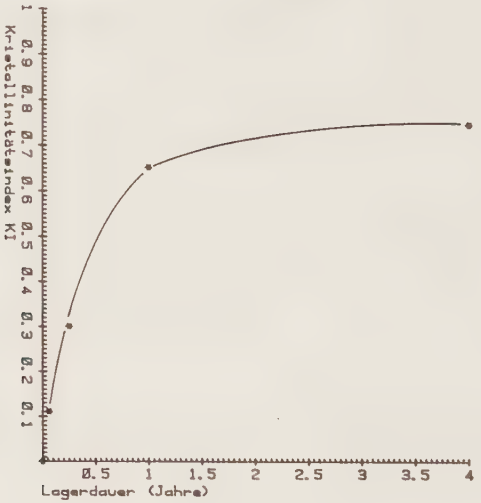


Abb. 25 KI-Zunahme in Abhängigkeit von der Lagerdauer

Auch im Polarisationsmikroskop konnte der Rekristallisationsprozeß gut an der Zunahme anisotroper Partikel beobachtet werden.

4.1.5. DTA-Untersuchungen von gelagertem sprühgetrocknetem Digoxigenin

Besonderes Augenmerk wurde auf die DTA-Untersuchungen der rekristallisierenden Produkte gerichtet, da hier weitere wichtige Aussagen zu erwarten waren. Die folgende Abbildung macht deutlich, daß sich dieser Prozeß in einer Reihe von Schritten äußert.

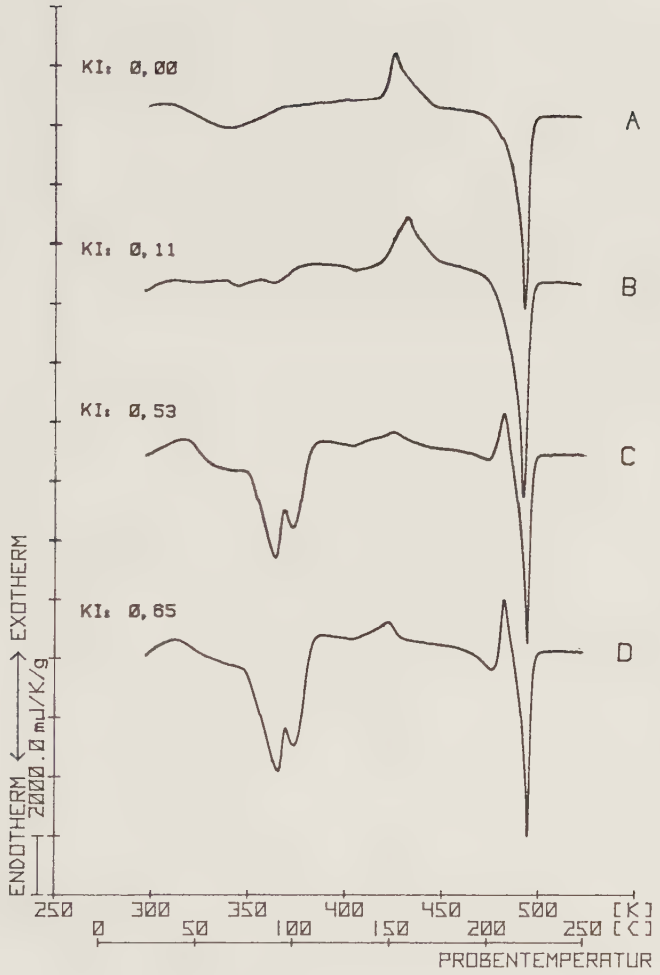


Abb. 26 DTA-Aufnahmen von sprühgetrocknetem Digoxigenin nach verschiedenen Lagerzeiten

A) nach Herstellung
B) nach 3 Wochen
C) nach 6 Monaten
D) nach 1 Jahr

Bei Betrachtung des Temperaturbereiches zwischen 293 K (20 °C) und 393 K (120 °C) erkennt man, daß die flach bauchförmige Auslenkung beim frischen Sprühprodukt mit zunehmender Lagerdauer zwei diskrete Spitzen ausbildet. Die erste wächst nach einigen Monaten stärker als die bei höheren Temperaturen liegende. Auch nach 4 Jahren erkennt man noch deutlich eine Auftrennung des ersten endothermen Signals in 2 Peaks (vgl. Abb. 27). Diese Auslenkungen stehen angesichts der Temperatur von 373 K (100 °C) in Zusammenhang mit entweichendem Wasser, das während der Lagerung aufgenommen wurde.

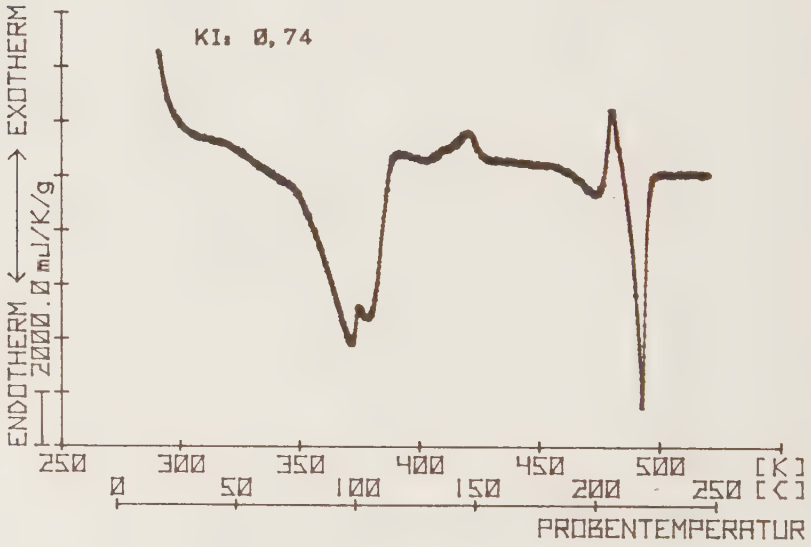


Abb. 27 DTA-Aufnahme von sprühgetrocknetem Digoxigenin nach 4 Jahren

Nach Herstellung von sprühgetrocknetem Digoxigenin beobachtet man bei ca. 423 K (150 °C) einen deutlich ausgeprägten exothermen Peak, der, wie bereits erwähnt, die Rekristallisation der Probe bedingt durch das Aufheizen bei der DTA anzeigt. Mit zunehmender Lagerungsdauer findet eine deutliche Abnahme dieser Aus-

lenkung statt, was auf die während der Lagerung stattgefundene zunehmende Kristallinität zurückzuführen ist.

Auffällig sind auch die Veränderungen im Temperaturbereich zwischen 463 K (190 °C) und 503 K (230 °C).

In einem drei Monate gelagerten Muster wurde erstmals eine vor dem Schmelzpeak bei 493 K (220 °C) auftretende vorgelagerte exotherme Auslenkung beobachtet. Nach weiteren drei Monaten entsteht vor diesem exothermen Peak im Bereich der Schmelztemperatur des in Wasser ausgefällten Digoxigenins (483 K, 210 °C), also bei 476 K (203 °C), ein zweiter endothermer Peak.

Bei der Röntgendiffraktometrie wurde sichtbar, daß sich das Peakmuster der kristallinen Ausgangssubstanz im Laufe der Lagerzeit wieder ausbildet. Das Anwachsen des DTA-Peaks bei 483 K (210 °C) dürfte also ebenfalls die Zunahme der kristallinen Ausgangssubstanz anzeigen.

Bisher nicht erklärbar sind aber nach diesen DTA-Untersuchungen die erwähnte exotherme Auslenkung bei etwa 483 K (210 °C) und die endotherme Auslenkung bei 493 K (220 °C). Aus diesem Grund wurden 12 Monate gelagerte Produkte mittels Polarisationsheizmikroskopie untersucht, um die ablaufenden Prozesse oberhalb 473 K (200 °C) optisch beobachten zu können.

Die Ergebnisse dieser Prüfungen werden im folgenden Abschnitt dargestellt.

4.1.6. Untersuchung der gelagerten Digoxigenin-Sprühprodukte mittels Polarisationsheizmikroskopie

Bei den PHMK-Untersuchungen wurde die gleiche Aufheizgeschwindigkeit wie bei den DTA-Messungen, also 5 K/min, gewählt. Auf diese Weise sollte es möglich sein, die in der DTA bei bestimmten Temperaturen festgestellten Signale mit entsprechenden mikroskopisch erkennbaren Veränderungen korrelieren zu können.

Aus der folgenden Bilderserie ist der oberhalb 473 K (200 °C) ablaufende Prozeß ersichtlich:

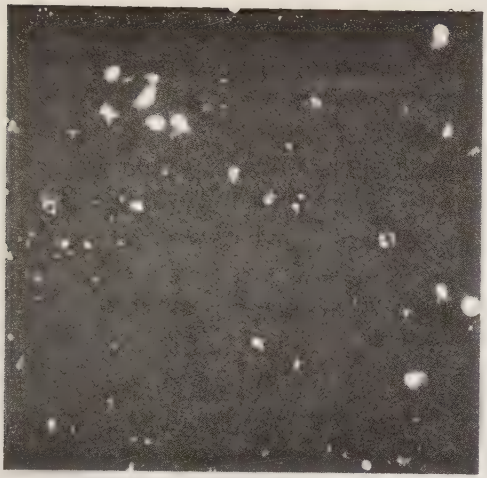
Abb. 28 PHMK-Aufnahmen von 12 Monate gelagerten Digoxigenin-Sprühprodukten ⟵100 µm

A) bei 373 K (100 °C)

B) bei 443 K (180 °C)

C) bei 478 K (205 °C)

D) bei 485 K (212 °C)



E) bei 490 K (217 °C)

- Die beiden endothermen DTA-Peaks im Bereich von 373 K (100 °C) gehen nicht mit irgendwelchen optisch erkennbaren Veränderungen einher (vgl. Abb. 28A).
- Bei RT weist die Probe neben kristallinen vorwiegend amorphe Anteile auf. Bei 423 K (150 °C) kann man eine Umwandlung der isotropen Teilchen in anisotrope Kristalle beobachten, so daß bei ca. 443 K (180 °C) praktisch nur noch anisotrope Teilchen sichtbar sind (vgl. Abb. 28B).
- Ab 478 K (205 °C) beginnt ein Teil der Kristalle zu schmelzen, was sich in einer Tröpfchenbildung äußert (vgl. Abb. 28C).
- Bevor die Tröpfchen aber völlig isotrop werden, setzt bereits ein gegenläufiger Prozeß ein. Von 485 K (212 °C) an bilden sich schlagartig kristalline Partikel in diesen Tröpfchen aus, was am Aufleuchten der Polarisationsfarben erkannt werden kann. Die äußere Form der Tröpfchen bleibt dabei erhalten (vgl. Abb. 28D).
- Ab 490 K (217 °C) beginnen diese auskristallisierten Teilchen erneut zu schmelzen, bis völlig isotrope Tröpfchen resultieren. Daneben schmilzt aber auch der andere Teil, der die beschriebene Umwandlung nicht erfahren hat (vgl. Abb. 28E).

Aus diesen Beobachtungen können folgende Schlüsse gezogen werden:

Während der Lagerung von zunächst amorphem Digoxigenin findet Rekristallisation statt. Nach dem Schmelzen bei 485 K (212 °C) wandelt es sich gleich anschließend in eine höher schmelzende Kristallform um, was bei der DTA durch einen exothermen Peak und bei der PHMK am Aufleuchten von Polarisationsfarben erkennbar ist. Nach dieser Umwandlung schmilzt die Substanz erneut bei 493 K (220 °C). Es kommt also bei dem gelagerten Sprühprodukt zu einer thermotropen Kristallumlagerung der kristallinen Anteile. Diese Umwandlung wird durch die bei 423 K (150 °C) kristallisierten, bei RT noch amorphen Anteile gefördert, da bei der kristallinen Ausgangssubstanz eine solche Umwandlung bei gleichen Versuchsbedingungen nicht beobachtet werden kann. Somit ist die Annahme gerechtfertigt, daß zwei Kristallmodifikationen auftreten können.

In der folgenden DTA-Kurve (Abb. 29, S. 73) sind die beschriebenen Vorgänge graphisch zusammengefaßt.

Bevor auf die unterschiedlichen Kristallmodifikationen näher eingegangen werden kann, sollen in den folgenden Abschnitten weitere Möglichkeiten erläutert werden, Digoxigenin zu amorphisieren. Daneben ist auch die Frage relevant, ob sich bei den auf anderem Wege in den amorphen Zustand überführten Substanzproben die gleichen thermischen Phänomene wie bei den Sprühprodukten feststellen lassen.

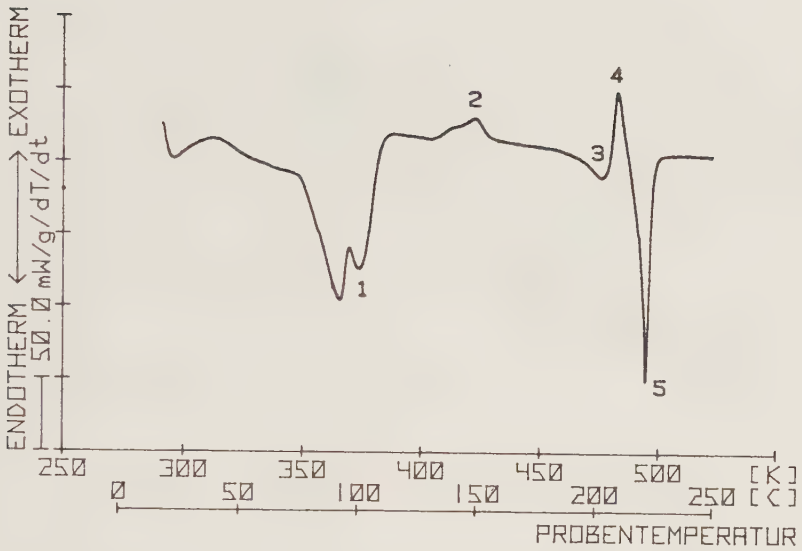


Abb. 29 Darstellung der PHMK-Befunde in einer DTA-Kurve von sprühgetrocknetem Digoxigenin nach einjähriger Lagerdauer

1) keine Veränderungen erkennbar
2) Kristallisation der ursprünglich amorphen Anteile
3) Schmelzen der von vorneherein vorliegenden Kristalle
4) Kristallisation dieser geschmolzenen Kristalle
5) Schmelzen aller Kristalle

4.2. Amorphisierung im Rotationsverdampfer

Durch Eindampfen einer chloroformhaltigen Digoxinlösung unter Rotation und vermindertem Druck konnte die Gewinnung einer weitgehend amorphen Substanz erreicht werden (7). Diese Aussage galt jedoch nur für das vollständige Glykosid; ob dieses Verfahren auch für das stärker zur Kristallisation neigende Aglykon, das Digoxigenin, angewendet werden kann, sollte im Folgenden geprüft werden.

4.2.1. Rotationsverdampfung aus ethanolischer Lösung

Die Annahme, daß Digoxigenin durch Abrotieren vollständig amorphisiert werden könne, ließ sich bei Einhaltung der in der folgenden Tabelle aufgeführten Herstellungsparameter bestätigen:

Tabelle 14 Bedingungen bei der Rotationsverdampfung

Kolbenvolumen	1000 ml
Volumen der Lösung	200 ml
Lösungsmittel	Ethanol 96 %
Konzentration	1 %
Rotationsgeschwindigkeit	200 UpM
Wasserbadtemperatur	323 K (50 °C)

In einem Röntgendiffraktogramm, das im Anschluß aufgenommen wurde, wird der amorphe Charakter deutlich (s. Abb. 30, S. 75).

Das gleiche Resultat ergibt sich aus der DTA-Kurve, das die folgende Abbildung 31 (S. 75) zeigt.

Nach einer endothermen Auslenkung mit Maximum bei 332,9 K (59,9 °C), die das Entweichen von Ethanolanteilen (Kp. 351 K, 78 °C) anzeigt, kommt es zu einem ausgeprägten exothermen Peak bei 454,5 K (181,5 °C).

Mittels PHMK konnte festgestellt werden, daß die amorphe Substanz in diesem Bereich vollständig rekristallisiert, um dann bei 494,2 K (221,2 °C) vollständig zu schmelzen.

Gleichfalls rein amorphe Produkte konnten durch Einsatz von 100-proz. Methanol und 100proz. Isopropanol sowie durch Chloroform als Lösungsmittel für Digoxigenin dargestellt werden.

Somit war bewiesen, daß das Abrotieren der genannten Lösungen zum gleichen Ergebnis führt wie die im vorherigen Abschnitt beschriebene Sprühtrocknung. Besonders deutlich wird das beim Vergleich mit den DTA-Kurven in Abb. 23, S. 62.

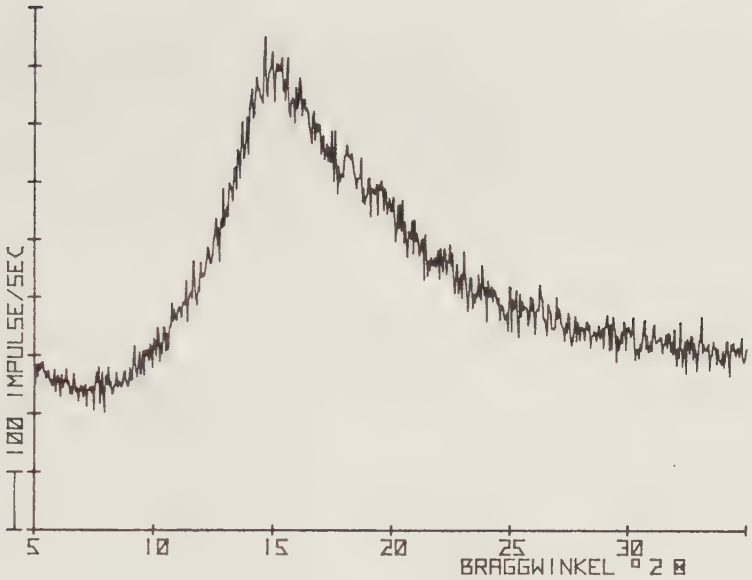


Abb. 30 Röntgendiffraktogramm von Digoxigenin nach Rotationsverdampfung aus ethanolischer Lösung

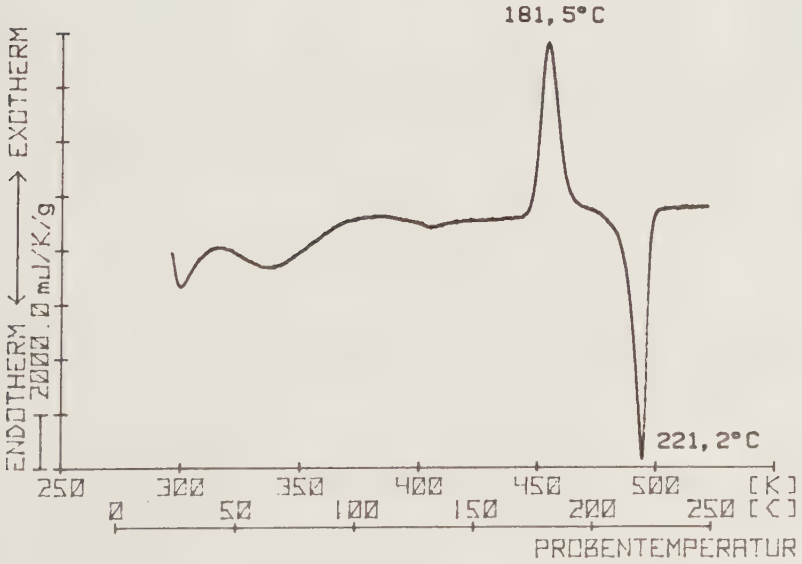


Abb. 31 DTA-Aufnahme von Digoxigenin nach Rotationsverdampfung aus ethanolischer Lösung

4.2.2. Einfluß des Ethanolgehaltes auf den Amorphitätsgrad

Bei DTA-Untersuchungen des nach der Vorschrift von SMITH (62) gewonnenen Digoxigenins, gemäß der die Entfernung des Lösungsmittels im Rotationsverdampfer erfolgt, ließ sich der in der folgenden Abbildung dargestellte Kurvenverlauf feststellen.

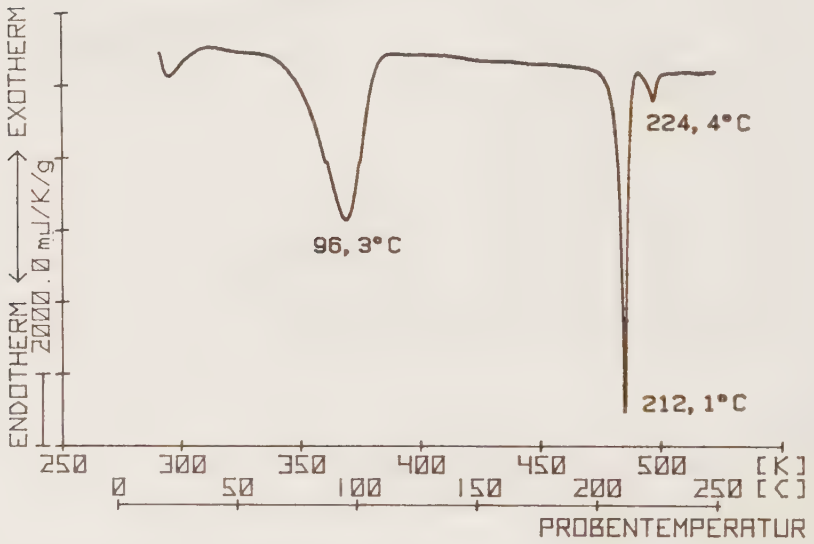


Abb. 32 DTA-Aufnahme von Digoxigenin nach Rotationsverdampfung aus 50proz. Ethanol

Diese DTA-Kurve unterscheidet sich ganz wesentlich von der unter dem vorangegangenen Unterpunkt beschriebenen. Sie zeigt keinen exothermen Rekristallisationspeak und gleicht mehr der Kurve des unter 3. beschriebenen Hydrats. Lediglich durch eine zweite endotherme Auslenkung im Bereich von 493 K (220 ^{o}C), die allerdings sehr klein ist, unterscheidet sie sich von jener.

Das RD des abrotierten Hydrolyseprodukts - vgl. Abb. 33 - zeigt ganz andere Merkmale als das des aus 96proz. Ethanol abrotierten Digoxigenins (vgl. Abb. 31, S. 75). Während ersteres eine überwiegend kristalline Substanz beschreibt (KI: 0,79), zeigt zweiteres den für ein röntgenamorphes Produkt typischen Verlauf.

Abb. 33 Röntgendiffraktogramm von Digoxigenin nach Rotationsverdampfung aus 50proz. Ethanol

Dieses Ergebnis war überraschend, da der einzige Unterschied zwischen beiden Produkten darin bestand, daß das Hydrolyseprodukt aus 50proz. Ethanol anfiel, während das unter 4.2.1., S. 74, beschriebene aus 96proz. Ethanol gewonnen wurde.

Da für die Hydrolyse immer analysenreines Digoxin verwendet wurde (vgl. 2.5., S. 20), konnte die Ursache nur im unterschiedlichen Ethanolgehalt liegen.

Der beschriebene Befund ist vergleichbar mit Untersuchungsergebnissen, zu denen BLACK et al. gelangten (6). Sie stellten nämlich fest, daß ursprünglich amorphes Digoxin partiell rekristallisierte, wenn es mit Wasser in Berührung gebracht wurde. Aus diesem Grunde wählten MÖLLER et al. bei der Gewinnung von amorphem Digoxin mittels Rotationsverdampfung 96proz. Ethanol als Lösungsmittel, obwohl Digoxin in verdünntem Ethanol besser löslich gewesen wäre (3).

Es konnte also davon ausgegangen werden, daß der Wassergehalt von 50 % in der Hydrolyselösung auch eine Rekristallisation des Digoxigenins begünstigt.

4.2.3. Rotationsverdampfung acetonischer Digoxigeninlösungen

Ganz anders lagen die Verhältnisse, wenn Aceton als Lösungsmittel herangezogen wurde. In diesem Solvens ist Digoxigenin sehr gut löslich (vgl. 5.2.4., S. 109). Beim Stehenlassen der Lösung an der Luft kristallisiert das Aglykon aufgrund des hohen Dampfdrucks von Aceton schnell aus.

Obwohl Aceton in der eingesetzten Qualität nur 0,5 % Wasser enthielt, konnte bei den geschilderten Verdampfungsbedingungen im Rotationsverdampfer kein vollamorphes Produkt gewonnen werden, wie die folgende Abbildung 34 (S. 79) aufzeigt.

Sie enthält zusätzlich zu den Peaks, die beim Abrotieren aus Ethanol aufgezeichnet wurden, eine exotherme Auslenkung bei 492 K (219 ^{o}C) und eine endotherme bei 487 K (214 ^{o}C).

Die Kurve weist gegenüber der des 12 Monate gelagerten Sprühproduktes (vgl. 4.1., S. 56) Gemeinsamkeiten auf. Sie zeigt im Temperaturbereich oberhalb 393 K (120 ^{o}C) wie jene zwei exotherme und zwei endotherme Auslenkungen.

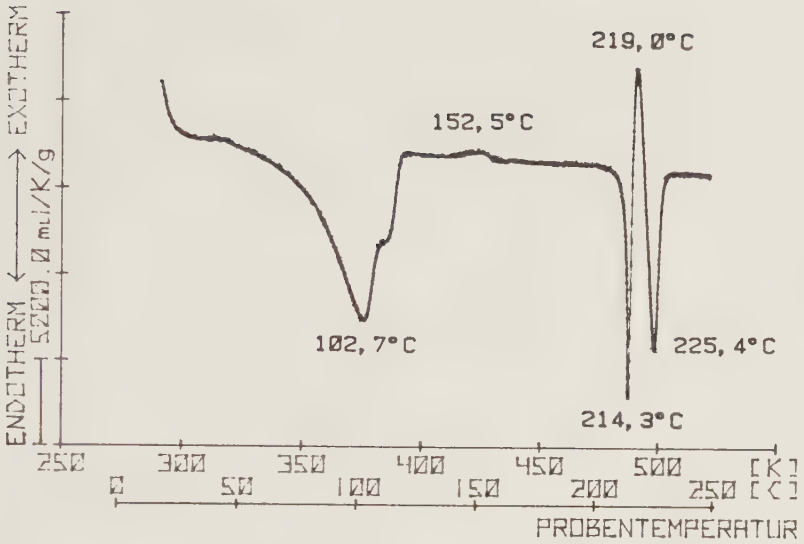


Abb. 34 DTA-Aufnahme von Digoxigenin nach Rotationsverdampfung aus Aceton

Die Ergebnisse röntgendiffraktometrischer und polarisationsmikroskopischer Untersuchungen, die unter gleichen Versuchsbedingungen durchgeführt wurden, entsprachen denen, die bei der Charakterisierung des gelagerten Sprühproduktes gewonnen wurden.

Digoxigenin, das aus Aceton abrotiert wurde, ist also nur teilamorph. Es kristallisiert unter den bei der Rotationsverdampfung herrschenden Versuchsbedingungen wesentlich schneller als an der Luft, so daß nur eine kleinere Menge durch die Rotationsbewegung des Kolbens, die die Kristallisation behindert, amorphisiert werden kann (vgl. Abb. 35).

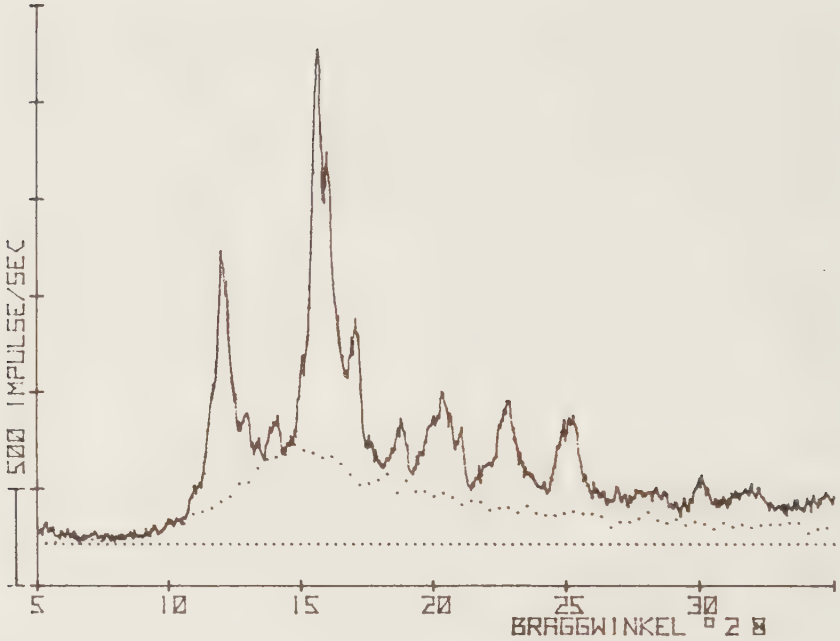


Abb. 35 Röntgendiffraktogramm von Digoxigenin nach Rotationsverdampfung aus Aceton

Besonders dieser Versuch macht deutlich, wie entscheidend der Lösungsmitteleinfluß neben der Zufuhr von "Rotationsenergie" zur Ausbildung amorpher Anteile ist.

4.2.4. Temperversuch

Die DTA-Kurve des Rotationsprodukts aus Aceton gleicht der eines 12 Monate gelagerten Sprühprodukts (vgl. 4.1.5., S. 66). Ob die bei der letztgenannten Probe polarisationsmikroskopisch gewonnenen Erkenntnisse übertragbar sind, sollte in einem Temperversuch überprüft werden:

Das Rotationsprodukt wurde in der DTA-Apparatur bis zum Erreichen des ersten Schmelzvorgangs, d.h. bis 483 K (210 °C) linear aufgeheizt und sofort anschließend wieder auf Raumtemperatur abgekühlt. Den beim zweiten Aufheizen bis 523 K (250 °C) erhaltenen Kurvenverlauf gibt die folgende Abbildung wieder.

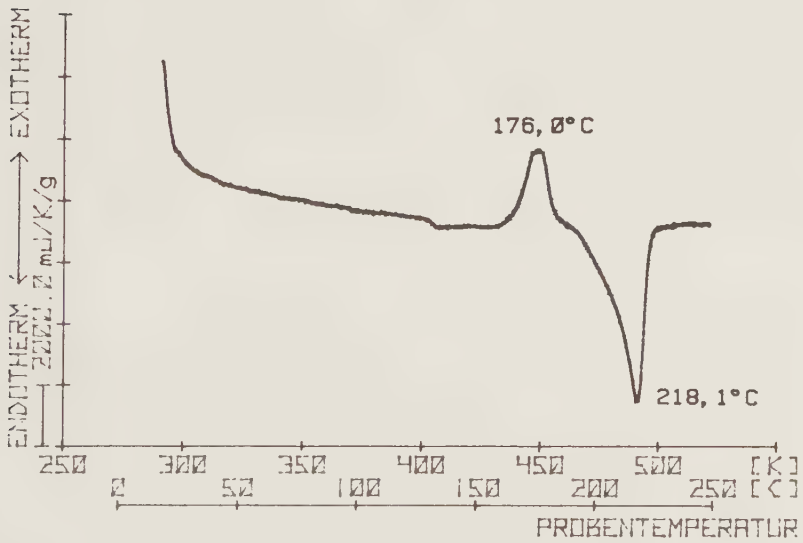


Abb. 36 2. Aufheizkurve von Digoxigenin nach Rotationsverdampfung aus Aceton

Im Gegensatz zur ersten Aufheizkurve (vgl. Abb. 34, S. 79) sind nur noch zwei Peaks zu erkennen: ein exothermer bei 449,0 K (176,0 °C) und ein endothermer bei 491,1 K (218,1 °C).

Der Kurvenverlauf läßt sich in der folgenden Weise interpretieren: beim ersten Aufheizen bis zum ersten Schmelzpunkt kommt es zu einer quantitativen Kristallisation der amorphen Anteile. Das bedeutet, daß zu Beginn des zweiten Aufheizvorgangs Kristalle der niedriger schmelzenden Form neben höher schmelzenden vorliegen. Letztere (Fp. 493 K, 220 °C) induzieren die Umwandlung der bei 483 K (210 °C) schmelzenden Kristalle in ihre Form, was sich im vorliegenden Falle in einer exothermen Auslenkung bei 449,0 K (176,0 °C) äußert.

Solche Modifikationsumwandlungen sind auch bei anderen steroidartigen Verbindungen, wie z.B. dem Betamethasonacetat, beobachtet worden (17,20).

Die im folgenden Abschnitt geschilderten Mahlversuche könnten weitere Anhaltspunkte für die Existenz zweier Kristallformen liefern, da hier die Überführung in den amorphen Zustand nicht "schlagartig" wie bei der Sprühtrocknung oder der Rotationsverdampfermethode erfolgt, sondern eine längere Zeitspanne erfordert.

4.3. Amorphisierung durch Mahlung

4.3.1. Mahlversuche in einer Mikroschnellmühle

Die Versuche mit dem Rotationsverdampfer zeigten, daß Digoxigenin bei mechanischer Beanspruchung, d.h. bei Zufuhr von "Rotationsenergie" - je nach Art des verwendeten Lösungsmittels zumindest teilweise - amorphisiert werden kann. Diese "Rotationsenergie" tritt aber bei diesem Verfahren eigentlich nur als Nebeneffekt auf, während die schnelle Verdampfung von Lösungsmittel im Vordergrund steht. Eine Störung oder Verhinderung von Kristallisationsvorgängen kann also sowohl durch mechanische Einflüsse, als auch durch die Trocknungsgeschwindigkeit erfolgen.

Das Mahlen hingegen, eine in der pharmazeutischen Technologie sehr gebräuchliche Methode, beinhaltet massive mechanische Bean-

spruchung für die so behandelte Substanz. Das ist auch beabsichtigt, da auf diesem Wege Wirkstoffe in feinere Korngrößen zerteilt werden sollen. Aus der damit verbundenen Oberflächenvergrößerung resultiert bei schwer wasserlöslichen Substanzen sehr häufig eine Steigerung der Wirksamkeit. Das klassische Beispiel hierfür ist Griseofulvin, bei dem durch Mikronisierung der Substanz eine Dosisreduzierung bei gleichbleibender Bioverfügbarkeit erzielt werden konnte (103,105).

SHAW et al. demonstrierten, daß auch die Bioverfügbarkeit von Digoxin von der Partikelgröße abhängig ist (106).

BLACK & LOVERING (4) sowie FLORENCE et al. (5) konnten am Beispiel des Digoxins eine partielle Amorphisierung nachweisen. Sie postulierten, daß Kristalle durch Mahlung eine amorphe Hülle ausbilden, die die Lösungsgeschwindigkeit der Kristalle stark verbesserte.

DÖLLE konnte diese Annahme durch rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen des gemahlenen Digoxins in eindrucksvoller Weise beweisen, indem er den Zusammenhang zwischen Mahldauer unter definierten Bedingungen und resultierendem Kristallitätsindex quantitativ darstellte (21). Auch er fand, daß die Lösungsgeschwindigkeit und Sättigungslöslichkeit durch Mahlung verbessert wurden.

Es läßt sich also zusammenfassend sagen, daß die tribomechanische Behandlung von organischen Wirkstoffen sowohl zur Abnahme des mittleren Korndurchmessers als auch zu einer zumindest teilamorphen Struktur führt. Beide Aspekte verbessern in der Regel die biopharmazeutischen Eigenschaften von Wirkstoffen.

Wie bei DÖLLE (21) und SEILLER (20) wurde bei eigenen Mahlversuchen eine RETSCH-Mikroschnellmühle mit Achatmahlgarnitur eingesetzt. Nach jeweils 2, 5, 10, 20, 40 und 80 Minuten wurden Substanzproben gezogen. Weitere Versuchsbedingungen enthält die folgende Tabelle:

Tabelle 15 Versuchsbedingungen und Resultate der Mahlung in einer RETSCH-Mikroschnellmühle

Ausgangssubstanz	:	Digoxigenin in Wasser ausgefällt
Ausgangsmenge	:	1000 mg
Pistill-Umdrehung	:	50 Skt
Mörser-Umdrehung	:	50 Skt
Mörser-Volumen	:	8 ml
Temperatur	:	293 K (20 °C)
d_{max} Ausgangssubstanz	:	100 µm
d_{max} nach 80 Minuten	:	45 µm

4.3.2. DTA-Untersuchungen der Mahlprodukte

Die DTA-Kurven der sechs Proben zeigen eine interessante Entwicklung auf (s. Abb. 37, S. 84).

Bereits nach einer Mahldauer von 2 Minuten ist eine zweite endotherme Auslenkung im Bereich von 493 K (220 °C) oberhalb des Schmelzpeaks des kristallinen Ausgangsprodukts bei 484 K (211 °C) zu erkennen, die - wie bereits unter 4.1.5., S. 66, nachgewiesen wurde - bei Vorliegen amorpher Anteile stets beobachtet wird.

Der Schmelzpeak des kristallinen Ausgangsmaterials wird immer kleiner und ist beim Produkt, das nach 40 Minuten erhalten wird, nicht mehr zu erkennen. Dafür wird der Schmelzpeak des aus dem amorphen Zustand kristallisierten Anteils immer größer.

Bereits nach einer Mahldauer von 5 Minuten tritt auch der schon erwähnte (vgl. 4.1.5., S. 66, und 4.2.4., S. 81) vorgelagerte exotherme Umwandlungspeak deutlich in Erscheinung. Bemerkenswert ist nach 20-minütigem Mahlen das Auftreten eines weiteren exothermen Peaks bei ca. 413 K (140 °C), der mit zunehmender Mahldauer die Größe des vorgenannten Umwandlungspeaks erreicht.

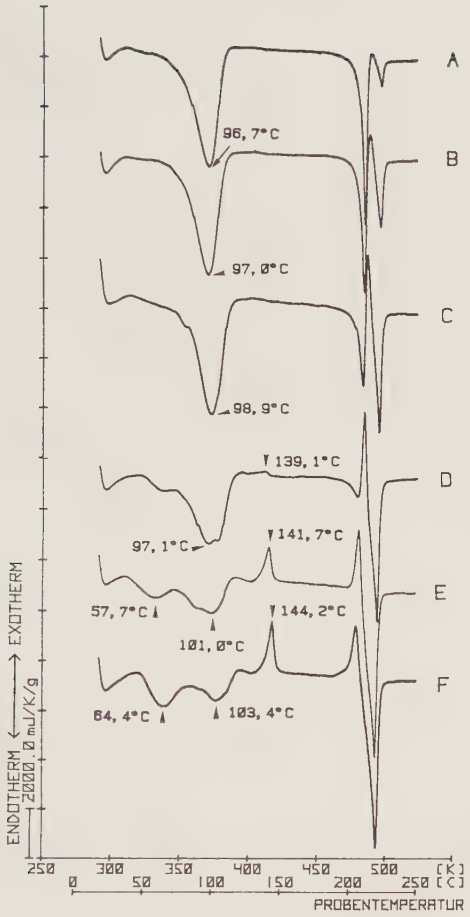


Abb. 37 DTA-Aufnahmen von Digoxigenin nach einer Mahldauer von

A) 2 Minuten
B) 5 Minuten
C) 10 Minuten
D) 20 Minuten
E) 40 Minuten
F) 80 Minuten

In diesem Falle handelt es sich um einen Indikator für die Kristallisation der amorphen Anteile.

Der endotherme "Wasserpeak" wird im Gegensatz dazu immer unschärfer und läßt damit einer bei niedrigeren Temperaturen liegenden Auslenkung Raum, die sich nach 20 Minuten Mahlen abzuzeichnen beginnt.

Dieser vorgelagerte Peak wird mit zunehmender Mahldauer, d.h. mit zunehmendem Amorphitätsgrad, immer größer. Vergleicht man die DTA-Kurven der amorphen Produkte (s. 4.1.3., S. 60 , und 4.2.1., S. 74) und der kristallinen Ausgangssubstanz (s. 3.2.1., S. 27) mit diesen Kurven, so ist folgende Interpretation zulässig. Der erste Peak bei 337,4 K (64,4 °C) beruht auf der Wasserabgabe aus dem amorphen Digoxigenin, der zweite Peak bei 376,4 K (103,4 °C) auf der Wasserabgabe aus der kristallinen Substanz. Aus diesem Ergebnis kann geschlossen werden, daß der molekulare Aufbau des Kristallgitters durch einwirkende Mahlkräfte nicht gestört wird.

Über den tatsächlichen Wassergehalt der Mahlprodukte mußte nun auch noch Klarheit gewonnen werden, um die Beobachtung mit weiteren Fakten abrunden zu können.

4.3.3. Bestimmung des Wassergehalts

Die Bestimmung des Wassergehalts wurde wieder thermogravimetrisch durchgeführt, um Korrelationen mit der DTA feststellen zu können. Jedes der Produkte wurde ca. eine Woche nach der Mahlung untersucht.

Das in der folgenden Tabelle dargestellte Ergebnis war, was nach den DTA-Kurven nicht vermutet werden konnte, ziemlich einheitlich.

Tabelle 16 Wassergehalt der Mahlproben

Mahldauer	Wassergehalt
5 Minuten	4,5 %
20 Minuten	4,5 %
40 Minuten	4,6 %
80 Minuten	4,7 %

Infolge der Oberflächenvergrößerung findet eine stärkere Wasseradsorption statt (vgl. Abb. 38).

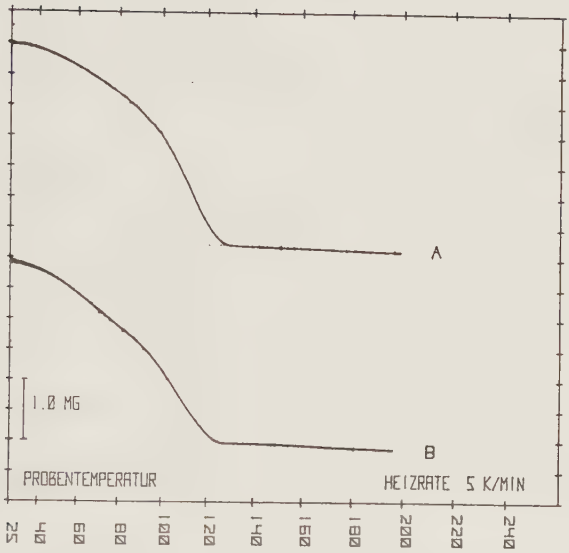


Abb. 38 TG-Kurven von Digoxigenin nach einer Mahldauer von
A) 5 Minuten B) 80 Minuten

Die TG-Kurven lassen sich jeweils in zwei Abschnitte untergliedern, die durch einen Knick bei 363 K (90 ^{o}C) getrennt werden.

Oberhalb dieser Temperatur fällt der Kurvenast flacher ab als unterhalb. Diese Erscheinung ist beim 80 Minuten Mahlprodukt gut zu erkennen. Das bedeutet, daß der im vorherigen Abschnitt (4.3.2., S. 84) erkannte zweistufige Wasserabgabprozeß auch in den TG-Kurven der entsprechenden Proben sichtbar gemacht werden kann.

Weitergehende Aussagen über die Mahlprodukte, den KI betreffend, werden im folgenden Abschnitt gemacht, der die Ergebnisse entsprechender röntgendiffraktometrischer Messungen zusammenfaßt.

4.3.4. Untersuchungen und Überlegungen zum Kristallinitätsgrad

Die folgenden Röntgendiffraktogramme zeigen, was DÖLLE (21) schon am Digoxin beobachten konnte: auch durch langdauerndes Mahlen ist keine vollständige Amorphisierung möglich.

Selbst das nach einer Mahldauer von 80 Minuten erhaltene Produkt zeigt im Röntgendiffraktogramm noch diskrete Spitzen über einem ausgeprägten Halo (s. Abb. 39, S. 89).

Deutlich wird dies auch an den Kristallinitätsindices, die für die einzelnen Mahlprodukte bestimmt wurden.

Die folgende Tabelle macht deutlich, daß der KI auch nach 80 Minuten Mahldauer nur auf 0,24 absinkt.

Tabelle 17 Kristallinitätsindices in Abhängigkeit von der Mahldauer

Mahldauer (min)	KI
0	0,84
2	0,81
5	0,80
10	0,75
20	0,59
40	0,43
80	0,24

Das bedeutet, daß immer noch gewisse kristalline Anteile in diesem Mahlprodukt enthalten sind.

Am KI des 20 Minuten-Mahlprodukts erkennt man, daß nach dieser Zeit der amorphe Anteil etwa genau so groß ist wie der kristalline. In der DTA-Kurve dieses Produkts (vgl. Abb. 37D, S. 85) wird deutlich, daß der erste exotherme Peak bei etwa 413 K (140 ^{o}C) erstmals nach 20 Minuten Mahldauer sichbar geworden ist.

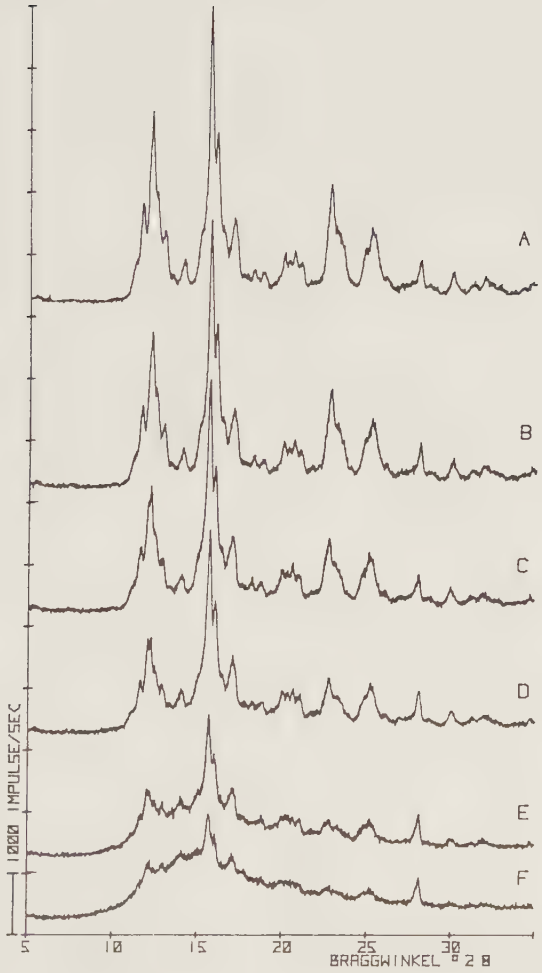


Abb. 39 Röntgendiffraktogramme von Digoxigenin nach einer Mahldauer von

A) 2 Minuten
B) 5 Minuten
C) 10 Minuten
D) 20 Minuten
E) 40 Minuten
F) 80 Minuten

Dieser Peak zeigt die Rekristallisation in jene Kristallform an, die bei 493 K (220 °C) schmilzt. Bewiesen ist dies durch das Vorhandensein einer entsprechenden Auslenkung bei den durch Sprühtrocknung (vgl. 4.1.6., S. 69) bzw. Rotationsverdampfung (vgl. 4.2.1., S. 74) gewonnenen vollamorphen Produkten. Es kann davon ausgegangen werden, daß dieser Vorgang auch schon bei den kürzer gemahlenen Produkten auftritt, aber unter den gewählten Bedingungen nicht in Form einer entsprechenden Auslenkung in Erscheinung tritt.

Die in der Probe noch enthaltenen kristallinen Anteile der Ausgangsform, also des in Wasser ausgefällten Produkts, schmelzen bei 483 K (210 °C). Dieser Vorgang tritt hier nur noch schwach in Erscheinung, da er von einem ausgeprägten exothermen Prozeß nahezu überlagert wird. Bei den länger als 20 Minuten gemahlenen Produkten ist das dann auch vollständig der Fall, da sich - wie die folgende Tabelle zeigt - das Maximum der exothermen Reaktion zu niedrigeren Temperaturwerten hin verschiebt:

Tabelle 18 Verschiebung des exothermen Peakmaximums in Abhängigkeit von der Mahldauer

Mahldauer (min)	Maximum der exothermen Reaktion (K)	(°C)
2	489,3	216,3
5	488,1	215,1
10	486,4	213,4
20	484,1	211,1
40	480,3	207,3
80	478,3	205,3

Diese exotherme Reaktion geht direkt über in einen endothermen Schmelzvorgang bei 493 K (220 °C)

Die im Zusammenhang mit den partiell rekristallisierten Sprühprodukten (vgl. 4.1.5., S. 66) und den Rotationsprodukten aus Aceton (vgl. 4.2.4., S. 81) getroffenen Oberlegungen lassen sich auch auf die DTA-Analyse der Mahlprodukte anwenden:

Bei dem Temperaturwert, bei dem das nicht amorphisierte Ausgangsmaterial schmilzt (483 K, 210 °C), liegen auch noch die Kristalle vor, die sich aus dem amorphen Anteil bei etwa 413 K (140 °C) gebildet haben. Diese wirken als Impfkristalle in der Schmelze und bewirken in einer exothermen Reaktion die Umwandlung in ihre höher schmelzende Kristallform. Die nun aus physikalischer Sicht einheitlichen Kristalle schmelzen bei ca. 493 K (220 °C).

In der folgenden Abbildung werden am Beispiel der DTA-Kurve des 20 Minuten-Mahlprodukts die beim Aufheizen von teilamorphen Produkten auftretenden Vorgänge nochmals zusammenfassend dargestellt.

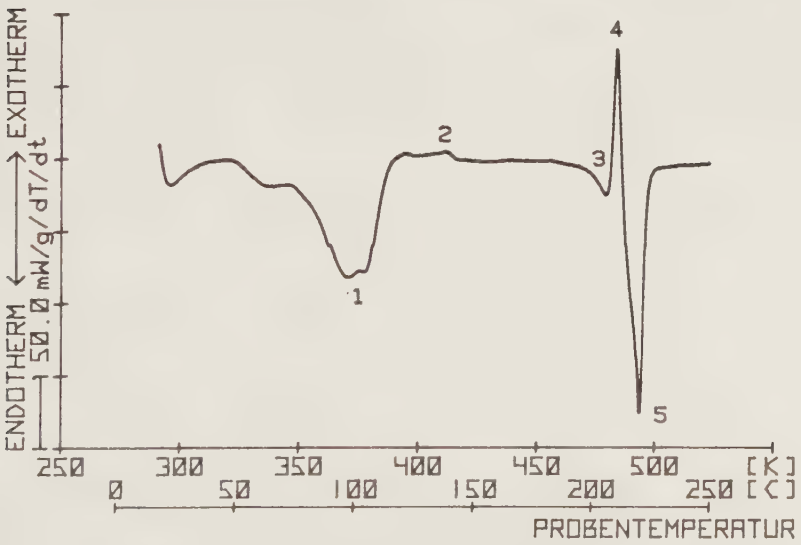


Abb. 40 DTA-Kurve von Digoxigenin nach einer Mahldauer von 20 Minuten
1) Entweichen von Kristallwasser
2) Kristallisation der bei 493 K (220 °C) schmelzenden Form aus amorphen Anteilen
3) Schmelzen der nicht amorphisierten Anteile bei 483 K (210 °C)
4) Rekristallisation der Schmelze aus 3) in die höher schmelzende Form
5) Schmelzen aller Kristalle bei 493 K (220 °C)

Als Beweis für die Richtigkeit der bisher angesprochenen Theorie muß aber noch die höher schmelzende Kristallform isoliert werden, die bislang nur thermotrop in der DTA zugänglich war.

Bevor auf entsprechende Versuche eingegangen werden kann, sollen im Folgenden noch die Beobachtungen dargestellt werden, die bei der Untersuchung von gelagerten Mahlprodukten gemacht wurden.

4.3.5. Lagerung der Mahlprodukte

Die unterschiedlich lang gemahlenen Proben wurden in verschlossenen Behältern bei Raumtemperatur gelagert und in bestimmten Zeitabständen mittels DTA und RD untersucht. Es zeigte sich, daß alle Produkte rekristallisierten. Die Geschwindigkeit, mit der dies geschah, entsprach der, die bei der Rekristallisation der Sprühprodukte beobachtet wurde (vgl. 4.1.5., S. 66).

Die folgenden DTA-Aufnahmen geben beispielsweise die Rekristallisation des 2 Minuten gemahlenen Produktes wieder (s. Abb. 41, S. 93).

Bereits nach 5 Monaten ist die Größe des endothermen Peaks bei 493 K (220 ^{o}C) deutlich reduziert. Das bedeutet, daß der amorphe Anteil zurückgegangen ist.

Die nach 2 Jahren aufgenommene DTA-Kurve zeigt schließlich den Verlauf des Ausgangsmaterials.

In zu gleichen Zeiten aufgenommenen Röntgendiffraktogrammen treten keine auffälligen Unterschiede auf, da der KI durch 2-minütiges Mahlen nur unwesentlich reduziert wird.

Anders sieht es aus bei der Rekristallisation der 80 Minuten gemahlenen Charge. In der folgenden Abbildung 42, S. 93 , ist deutlich die Abnahme des amorphen Halos innerhalb von 9 Monaten zu erkennen.

Vom KI her entspricht dieses Produkt einem 20 Minuten gemahlenen gleich nach der Herstellung.

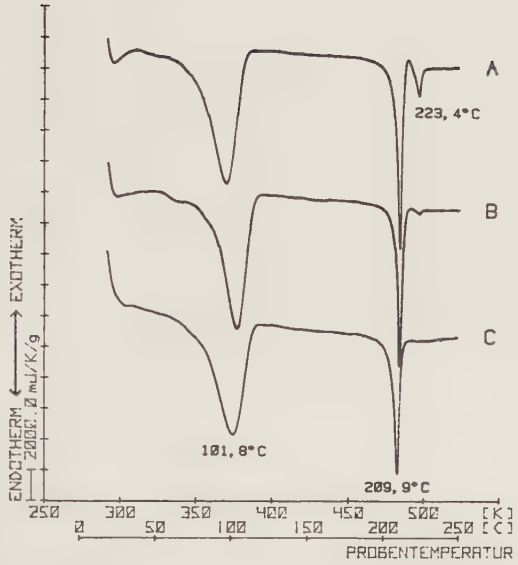


Abb. 41 DTA-Aufnahmen von 2 Minuten gemahlenem Digoxigenin nach unterschiedlicher Lagerdauer
A) nach Herstellung
B) nach 5 Monaten
C) nach 2 Jahren

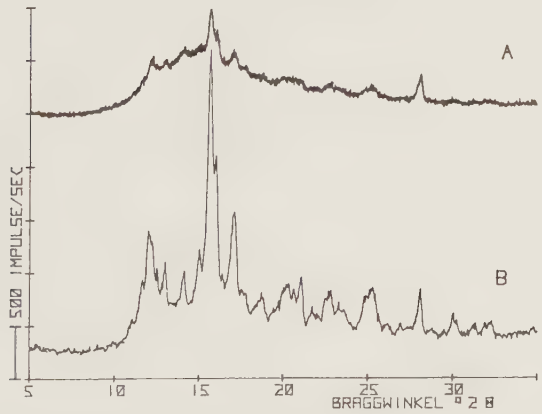


Abb. 42 Röntgendiffraktogramme von 80 Minuten gemahlenem Digoxigenin nach unterschiedlicher Lagerdauer
A) nach Herstellung KI: 0,24
B) nach 9 Monaten KI: 0,57

Der Verlauf der DTA-Kurven wandelt sich in gleicher Weise. Diese Untersuchungen, verglichen mit den Beobachtungen bei der Rekristallisation der Sprühprodukte, zeigen, daß der gleiche thermodynamische Prozeß abläuft.

Verständlich wurde er durch die Mahlversuche, weil hier ansteigende Amorphitätsgrade hergestellt wurden, die jeweils für sich charakterisiert werden konnten.

Bei der Rekristallisation des amorphen Digoxigenins wurden diese wieder durchlaufen. So konnte festgestellt werden, daß die bei der Lagerung des amorphen Digoxigenins zu verschiedenen Zeiten beobachteten Phänomene ausschließlich auf Rekristallisationsvorgängen beruhten.

Es interessierte nun, ob beim Mahlen von sprühgetrocknetem Digoxigenin eine Rekristallisation zu beobachten ist oder nicht.

Entsprechende Versuche werden im folgenden Abschnitt dargestellt.

4.4. Tribomechanische Behandlung von sprühgetrocknetem Digoxigenin

4.4.1. Bemerkungen zum tribomechanischen Gleichgewicht

JUNGINGER stellte am Beispiel des Sulfanilamids (107), von dem zwei verschiedene Modifikationen existieren, fest, daß sich durch mechanische Energiezufuhr ein sogenanntes "tribomechanisches Gleichgewicht" erzielen läßt (188,189).

Das bedeutet, daß sich nach längerer Mahldauer - unabhängig von der Ausgangsmodifikation - mengenmäßig ein Gleichgewicht zwischen metastabiler und stabiler Phase ausbildet (108).

Beispiele tribomechanischer Modifikationsgleichgewichte bei anorganischen Substanzen wurden von SCHRADER et al. am Beispiel von $CaCO_3$ und PbO_2 beschrieben (109,110).

DÖLLE konnte dagegen bei der Mahlung von sprühgetrocknetem Digoxin die Ausbildung eines direkten Gleichgewichts zwischen amorpher und kristalliner Form nicht feststellen (21). Dagegen konnte er nachweisen, daß sich durch mechanische Energiezufuhr im amorphen Digoxin eine parakristallin-amorphe Zweiphasenstruktur ausbildet.

Durch entsprechende Behandlung des Digoxigenins sollte überprüft werden, ob sich die Entstehung von Parakristallen auch beim Aglykon induzieren läßt.

4.4.2. Untersuchung des gemahlenen Sprühtrocknungsprodukts

Sprühgetrocknetes Digoxigenin (vgl. 4.1., S. 56) wurde in der erwähnten Mikroschnellmühle bei den unter 4.3.1., S. 84 , beschriebenen Bedingungen gemahlen. Nach jeweils 5, 10, 20 und 30 Minuten wurden Proben gezogen und mit den beschriebenen Analysenmethoden wie Röntgendiffraktometrie, Polarisationsheizmikroskopie und Differentialthermoanalyse untersucht.

RD-Messungen im Bereich von 5^{o} bis 35^{o} 2Θ wiesen ein vollamorphes Produkt nach (vgl. Abb. 21, S. 60).

Polarisationsmikroskopische Untersuchungen zeigten den gleichen Sachverhalt, d.h. es waren keine Polarisationsfarben zu erkennen. Dieses Ergebnis steht im krassen Gegensatz zu dem Phänomen, das DÖLLE (21) am Digoxin beobachten konnte. Er stellte nämlich fest, daß durch Sprühtrocknung amorphisiertes Digoxin in Abhängigkeit von der anschließenden Mahldauer im Weitwinkelbereich zwar röntgenamorph ist, aber unter dem Polarisationsmikroskop geordnete Strukturen, kenntlich am Auftreten von Polarisationsfarben, aufweist. Dies wertete er als ersten Hinweis auf das Vorhandensein von Parakristallen, deren Existenz er im Folgenden durch weitere Analysenmethoden bestätigte.

Bei analogen Untersuchungen des Digoxigenins fiel auf, daß die gemahlenen Partikel weitgehend ihre für Sprühtrocknungsprodukte

charakteristische Kugelform verloren haben.

In der folgenden rasterelektronenmikroskopischen Aufnahme sind neben einer größeren Zahl völlig unveränderter Teilchen auch solche zu erkennen, die nicht nur deformiert, sondern auch offensichtlich durch plastisches Fließen zu größeren Einheiten fusioniert sind. Im Gegensatz zu den von DÖLLE beschriebenen, als parakristallin bezeichneten Aggregaten, ist bei den hier entstandenen Produkten kein einheitlicher Ordnungszustand, sondern eine unregelmäßige Zusammenlagerung von deformierten Einzelpartikeln festzustellen.

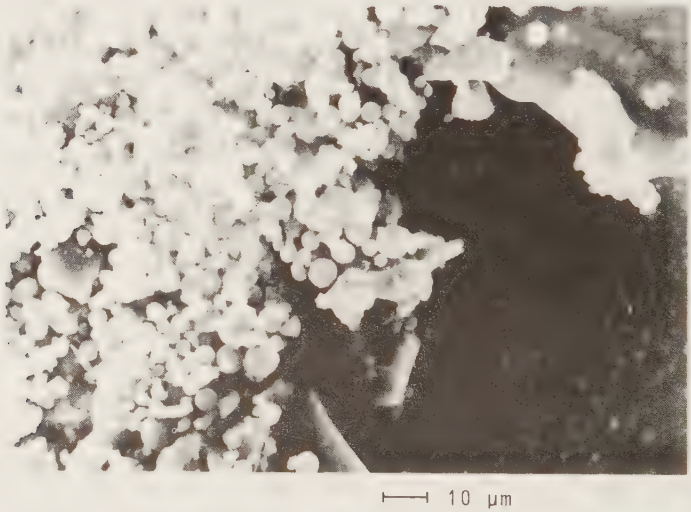


Abb. 43 REM-Aufnahme eines gemahlenen Sprühtrocknungsprodukts

DTA-Messungen der einzelnen verschieden lang gemahlenen Proben zeigten keine Unterschiede im Kurvenverlauf. DÖLLE dagegen hatte bei entsprechend behandelten Digoxinproben das Auftreten eines zweiten exothermen Peaks festgestellt, der in Abhängigkeit von der Mahldauer größer wurde und den Übergang der parakristallinen Anteile in die kristalline Form - vor dem Schmelzen - anzeigte.

Die folgende Abbildung der DTA-Kurve des 30 Minuten gemahlenen Aglykons zeigt einen Rekristallisationspeak bei 442,5 K (169,5 °C). Auch aus diesem Ergebnis kann kein Hinweis auf das Vorliegen parakristalliner Zustände abgeleitet werden. Da bei den 5, 10 und 20 Minuten gemahlenen Proben der gleiche Kurvenverlauf zu beobachten ist, steht die Kurve des 30 Minuten-Mahlprodukts stellvertretend für die anderen. Sie zeigt den gleichen Verlauf wie die eines vollamorphen Produkts.

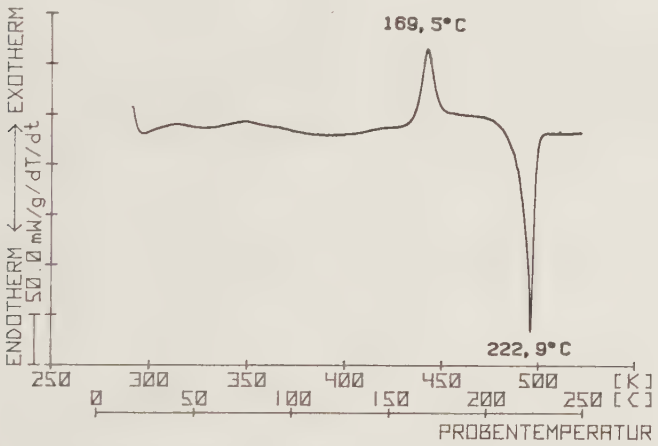


Abb. 44 DTA-Aufnahme des 30 Minuten gemahlenen Sprühprodukts

Das Resultat der Versuche läßt sich folgendermaßen zusammenfassen:

Das vollamorphe sprühgetrocknete Digoxigenin zeigt unter dem Einfluß von tribomechanischen Kräften keine Tendenz zu rekristallisieren oder parakristalline Zustände auszubilden. Es behält seinen amorphen Zustand bei, wobei allerdings die Gestalt der einzelnen Partikel durch plastisches Fließen verändert ist. Die erhaltenen Partikel kristallisieren sehr langsam, d.h. der Vorgang war nach 2 Jahren noch nicht abgeschlossen. Sie verhalten sich demzufolge wie die ungemahlenen amorphen Produkte.

Dieses Ergebnis läßt den Schluß zu, daß das Auftreten von Parakristallen beim Digoxin an das Vorhandensein glykosidisch verknüpfter Zuckermoleküle (Digitoxose) gebunden ist.

4.5. Inhibierung der Rekristallisation amorpher Produkte

4.5.1. Einbettung in makromolekulare Hilfsstoffe

Ursprünglich amorphe Digoxigeninprodukte weisen, wie in den vorangegangenen Abschnitten festgestellt wurde, die Tendenz auf zu rekristallisieren, d.h. sich in die Ausgangsform des Hydrats zurückzuverwandeln. Dieser Vorgang tritt sowohl bei den durch Sprühtrocknung als auch bei den durch Rotationsverdampfung gewonnenen Produkten auf.

Ausgehend von den Untersuchungen NORNBERG's (47,99), der durch einen Kolloidzusatz die partielle Kristallisation von gesprühtem Prednisolon verhindern konnte, sollte ermittelt werden, ob dies bei Digoxigenin zum gleichen Ergebnis führt.

Für die Herstellung entsprechender Sprüheinbettungen des Digoxigenins wurden Polyvinylpyrrolidon (PVP) und Celluloseether wie Methylcellulose (MC) und Hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) als makromolekulare Grundlage herangezogen.

Es kamen nur solche Kolloide in Betracht, die sowohl in organischen Lösungsmitteln als auch in Wasser löslich waren, um die Zweistoffdüsen- direkt mit der Dreistoffdüsentechnik vergleichen zu können. Im Rotationsverdampfer wurden nur nichtwäßrige Lösungen eingesetzt.

In der folgenden Tabelle 19, S. 99 , sind die verwendeten Kolloide zusammengefaßt.

Tabelle 19 Kennzahlen der für die Sprüheinbettung eingesetzten Makromoleküle

Typ	Handelsname	Hersteller	M_r	Viskosität (mPa·s)
MC	Methocel A 15	DOW	13.000	15
HPMC	Methocel E 5	DOW	-	5
	Methocel E 15	DOW	-	15
PVP	Kollidon 17	BASF	ca. 11.500	1,4
	Kollidon 25	BASF	ca. 25.000	1,8

Eine zweite Tabelle gibt Aufschluß über die Konzentrationsverhältnisse der eingesetzten Lösungen bei den verschiedenen Trocknungsverfahren:

Tabelle 20 Zusammensetzung der digoxigeninhaltigen Kolloidlösungen

	Sprühtrocknung	
Trocknungsverfahren	Zweistoffdüse Rotationsverdampfer	Dreistoffdüse -
Kolloid	4,5 g in 200 ml	4,5 g in 150 ml H_2O (=3%)
Digoxigenin	0,5 g $\}$ $CHCl_3/CH_3OH$ 7:3 (=2,5%)	0,5 g in 50 ml CH_3OH (=1%)

Bei den Trocknungsverfahren wurden die schon unter 4.1.2., Seite 58 , und 4.2.1., Seite 74 , angeführten Versuchsbedingungen eingehalten.

4.5.2. Untersuchung der erhaltenen Einbettungen

Mikroskopisch unterschieden sich die nach verschiedenen Trocknungsverfahren gewonnenen Produkte durch ihre äußere Gestalt: Nach Sprühtrocknung wiesen die Produkte die schon erwähnte Kugelform auf, nach Rotationsverdampfung dagegen waren sie schuppenförmig.

Die erhaltenen Produkte waren in allen Fällen vollamorph und behielten diesen Zustand auch während einer dreijährigen Lagerdauer bei, wie die in der folgenden Abbildung dargestellten Röntgendiffraktogramme am Beispiel einer MC E5-Sprüheinbettung aufzeigen.

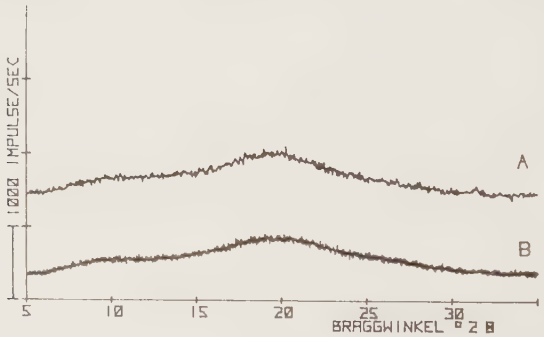


Abb. 45 Röntgendiffraktogramme von Digoxigenin-MC E5-Sprüheinbettungen (1 : 9 aus Zweistoffdüse) nach
A) Herstellung B) 3 Jahren Lagerung

Neben der Verhinderung einer Rekristallisation bei Lagerung bewirkt der Kolloidanteil bekanntlich auch eine Verbesserung der Lösungseigenschaften. Der Übersättigungsgrad der Lösung, der sich durch den Einsatz von sprühgetrocknetem Wirkstoff erzielen läßt, wird stabilisiert bzw. erfährt sogar in manchen Fällen eine Steigerung, wie DÖLLE an Digoxigenin-MC E5-Einbettungen demonstrieren konnte (21). Auf diese Erscheinungen wird in einem späteren Abschnitt noch näher eingegangen (vgl. 6.3.3., S. 176).

Zusammenfassend läßt sich also feststellen, daß sich die beobachtete Rekristallisation von amorphem Digoxigenin durch die molekulardisperse Verteilung zwischen Makromolekülen (Verhältnis Wirkstoff zu Kolloid 1 : 9) verhindern läßt. Da dieser Verteilungszustand aber an einen Lösungsschritt gekoppelt ist, läßt er sich nicht bei der Stabilisierung von Mahlprodukten einsetzen.

Der folgende Abschnitt bietet einen Oberblick über die in diesem Kapitel gewonnenen Erkenntnisse.

4.6. Zusammenfassung

Die Resultate der verschiedenen Amorphisierungsversuche lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- Sowohl die Sprühtrocknung aus organischem als auch aus überwiegend wäßrigem Medium führt zu röntgenamorphen Produkten.
- Auch die Rotationsverdampfungsmethode ist grundsätzlich zur Gewinnung von amorphem Digoxigenin geeignet. Bei Lösungsmitteln mit einer geringeren Verdampfungsenthalpie allerdings tritt der Einfluß der auftretenden Scherkräfte und des Wassergehalts stärker in Erscheinung.
- Sprühgetrocknetes und rotationsverdampftes Digoxigenin sind bezüglich ihrer Eigenschaften (DTA, RD, Löslichkeit) identisch.
- Die tribomechanische Behandlung von Digoxigenin führt in Abhängigkeit von der Mahldauer zu zunehmend amorphen Produkten. Vollständige Amorphisierung läßt sich jedoch nicht erreichen.
- Die Mahlung von sprühgetrocknetem Digoxigenin führt zu keiner Änderung des amorphen Charakters; eine Rekristallisation oder das Auftreten von Parakristallen lassen sich nicht nachweisen.
- Amorphe und teilamorphe Digoxigeninchargen rekristallisieren bei Lagerung unter normalen Laborbedingungen langsam in die Ausgangsform, deren Schmelzpunkt bei 483 K (210 ^{o}C) liegt.

Die resultierenden Produkte entsprechen den bei der tribomechanischen Behandlung gewonnenen.

- Im Falle der Sprühtrocknung und der Rotationsverdampfung läßt sich dieser Vorgang durch den Zusatz von Kolloiden zur Wirkstofflösung vollständig inhibieren.
- Beim linearen Aufheizen rekristallisieren vollamorphe Produkte in einer Zustandsform, die um 10 K höher schmilzt (493 K, 220 ^{o}C) als das Ausgangsmaterial.
- Beim Aufheizen der teilamorphen Produkte entstehen aus den amorphen Anteilen Kristalle der höher schmelzenden Form. Diese wirken als Impfkristalle beim weiteren Aufheizen, so daß schließlich nur diese höher schmelzende Form resultiert.

Untersuchungsgegenstand des folgenden Kapitels soll die bisher nur thermotrop nachgewiesene höher schmelzende Form des Digoxigenins sein. Wenn es gelingt, diese Kristallform auf einem weiteren Wege in reiner Form darzustellen, kann beim Digoxigenin vom Auftreten zweier polymorpher Modifikationen gesprochen werden.

5. Das polymorphe Digoxigenin

5.1. Allgemeines zur Polymorphie

Die Entdeckung der Polymorphie wird im Allgemeinen MITSCHERLICH zugeschrieben, da er diesen Ausdruck als erster bei der Beschreibung zweier verschiedener Formen des Natriumphosphatmonohydrats gebrauchte (112). Benzamid war die erste Substanz aus der organischen Chemie, für die dieses Erscheinungsbild nachgewiesen werden konnte (113).

HALEBLIAN und Mc CRONE (111,185) verstehen unter Polymorphie das Phänomen, daß eine chemische Verbindung im festen Zustand mindestens zwei verschiedene Strukturtypen, die Modifikationen genannt werden, besitzt (vgl. 2.4., S. 19).

Die Unterschiede in der Molekularanordnung werden durch Polarisierbarkeitseffekte zwischen den Molekülen hervorgerufen, die auf eine veränderte relative Lage der benachbarten Moleküle in unterschiedlichen Kristallstrukturen beruhen (111).

Das Vorliegen polymorpher Strukturen kann deshalb nur mit physikalischen Untersuchungsverfahren erkannt werden, da aus chemischer Sicht Identität gegeben ist. Gegenstand der Untersuchung sind deshalb z.B. Dampfdruck, Schmelzpunkt, Schmelzwärme, Dichte, Leitfähigkeit und Löslichkeit.

Abgegrenzt werden muß der Begriff der Polymorphie gegenüber der dynamischen Isomerie und der Tautomerie, da diese Erscheinungen zu unterschiedlichen Molekülen führen (111).

Die Fähigkeit zur Ausbildung von Solvaten und Hydraten, die sich naturgemäß von den lösungsmittelfreien Kristallen unterscheiden, wird unter einem eigenen Oberbegriff zusammengefaßt, der sog. P s e u d o p o l y m o r p h i e (15).

Auch amorphe oder parakristalline Zustandsformen einer gegebenen Substanz dürfen nicht mit dem Begriff Polymorphie belegt werden.

In diesem Sinne können also verschiedene Arten von Festkörper-Formen unterschieden werden, wobei eine polymorphe Modifikation nur eine der Möglichkeiten darstellt, in der eine Substanz in fester Form existieren kann (63).

5.2. Herstellung polymorpher Formen

Für die gezielte Gewinnung definierter Modifikationen sind in der Literatur eine Reihe von Herstellungsverfahren beschrieben, die in der folgenden Zusammenstellung aufgeführt sind (14,20, 104,107,111,114):

- Einwirkung mechanischer Kräfte,
  z.B. durch Mahlung oder Tablettierung
- Thermotrope Umwandlung
- Kristallisation aus der Dampfphase
- Kristallisation aus der Schmelze
- Kristallisation aus verschiedenen Lösungsmitteln.

Nach KUHNERT-BRANDSTÄTTER stellt die Kristallisation aus der Schmelze der Untersuchungssubstanz das am besten geeignete Verfahren zur Gewinnung polymorpher Modifikationen dar, da Störeffekte weitgehend ausgeschieden werden können (115). Dieses Verfahren läßt sich aber verständlicherweise auf thermolabile Verbindungen nicht anwenden (15).

Auch Digoxigenin stellt eine solche Substanz dar, was sich im PHMK an der bräunlichen Verfärbung der Schmelztröpfchen feststellen läßt.

Die Kristallisation aus unterschiedlichen Lösungsmitteln hingegen läßt bei entsprechender Versuchsdurchführung eine übermäßige thermische Belastung ausschließen, so daß bei der Herstellung polymorpher Modifikationen auf dieses Verfahren zurückgegriffen wurde. Voraussetzung für die Eignung als Lösungsmittel war, daß sich beim Lösungsvorgang weder der lösende noch der gelöste

Stoff chemisch veränderten. Ebenso wurde darauf geachtet, daß die verwendeten Lösungsmittel p.a.-Qualität aufwiesen, um etwaige Einflüsse von Verunreinigungen u.ä. auszuschließen.

In den folgenden Abschnitt soll nun auf die Auswirkung der unterschiedlichen physikalischen Eigenschaften von Lösungsmitteln auf die daraus gewonnenen Kristallisate eingegangen werden.

Bei allen Kristallisationsversuchen wurden 1proz. Lösungen hergestellt und das Lösungsmittel bei 353 K (80 ^{o}C) im Trockenschrank wieder abgedampft. Die erhöhte Temperatur trug dem Umstand Rechnung, daß manche der verwendeten Lösungsmittel einen bei Raumtemperatur relativ niedrigen Dampfdruck bzw. einen relativ hohen Siedepunkt aufweisen und sollte somit für gleiche Versuchsbedingungen sorgen. Gleichzeitig diente sie der Entfernung von Lösungsmittelresten aus den erhaltenen Kristallen, die sonst eventuell für eine Verfälschung der Untersuchungsergebnisse gesorgt hätten.

5.2.1. Kristallisation aus apolaren Lösungsmitteln

Unter apolaren Verbindungen versteht man in der Chemie solche, die sich weder elektrolytisch zerlegen lassen noch ein elektrisches Dipolmoment besitzen (117). Typische Vertreter sind z.B. n-Heptan, Cyclohexan und Toluol. In diesen Lösungsmitteln ist Digoxigenin aber aufgrund seines eigenen polaren Aufbaus unlöslich. Lediglich in Chloroform, das aufgrund seines Molekülaufbaus an der Grenze zu den polaren Lösungsmitteln steht, ist eine Löslichkeit gegeben, die Kristallisationsversuche sinnvoll erscheinen ließ.

Das trockene Digoxigenin erschien im Polarisationsmikroskop glasartig isotrop und ließ auch bei der Röntgendiffraktometrie einen amorphen Zustand erkennen, wie die folgende Abbildung ausweist.

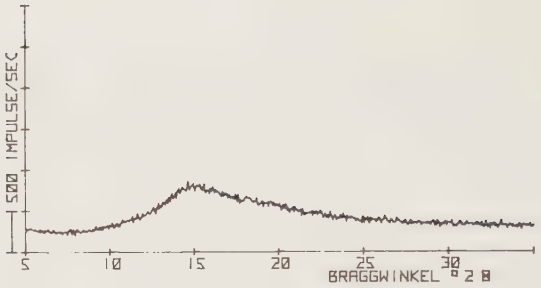


Abb. 46 Röntgendiffraktogramm von Digoxigenin nach Kristallisation aus Chloroform

Auch die DTA-Kurve zeigt den von den Sprühtrocknungsprodukten her bekannten Verlauf (vgl. Abb. 23, S. 62).

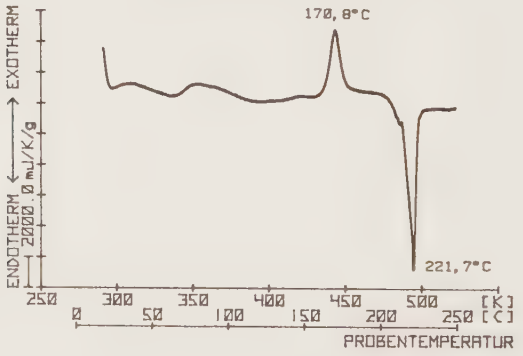


Abb. 47 DTA-Aufnahme von Digoxigenin nach Kristallisation aus Chloroform

Aufgrund dieser Ergebnisse stellt das Verdampfen chloroformhaltiger Digoxigeninlösungen ein weiteres Verfahren zur Gewinnung amorpher Produkte dar, das mit den unter 4.1.2., S. 58 , und 4.2.1., S. 74, vorgestellten gleichwertig ist.

5.2.2. Kristallisation aus Methanol, Ethanol und Aceton

Diese Lösungsmittel gehören zur Gruppe der polaren Verbindungen. Methanol und Ethanol stellen protische, Aceton ein aprotisches Lösungsmittel dar. Aus jedem Medium wurde ein kristallines Produkt erhalten.

DTA-Kurven und Röntgendiffraktogramme, die von den trockenen Produkten aufgenommen wurden, zeigen den Verlauf des Ausgangsmaterials (vgl. Abb. 9, S. 27, und Abb. 10, S. 31). Das bedeutet, daß die Substanz kristallin in Form des Hydrats anfiel. Das ist um so bemerkenswerter, als die verwendeten Alkohole relativ wenig Wasser enthielten: im Falle des Methanols waren es 0,05 % und im Falle des Ethanols 0,2 %. Das verwendete Aceton enthielt auch nur 0,4 % Wasser.

Digoxigenin verhält sich also praktisch wie das von KUHNERT-BRANDSTÄTTER untersuchte β-Östradiol. Die Affinität dieser Substanz zu Wasser ist so groß, daß die Luftfeuchtigkeit genügt, um bei der Kristallisation aus absoluten Lösungsmitteln das Hydrat entstehen zu lassen (15).

5.2.3. Kristallisation aus Acetonitril und Dimethylformamid

Aus der Gruppe der polaren aprotischen Lösungsmittel wurden Acetonitril und Dimethylformamid eingesetzt. Beide Lösungsmittel sind mit Wasser mischbar. In der verwendeten Qualität jedoch wiesen sie einen Wassergehalt von unter 0,2 % auf.

Bei DT-Analysen der aus diesen Lösungsmitteln angefallenen Kristalle ergab sich ein völlig anderes Bild als bisher beobachtet. Die folgende Abbildung zeigt, daß Digoxigenin jetzt bei etwa 4 9 3 K (220 °C) schmilzt. Bemerkenswert ist auch das Fehlen eines endothermen Peaks, der eine Wasserabgabe anzeigen würde. Digoxigenin ist in der vorliegenden Form also wasserfrei, was durch TG-Untersuchungen bestätigt werden konnte.

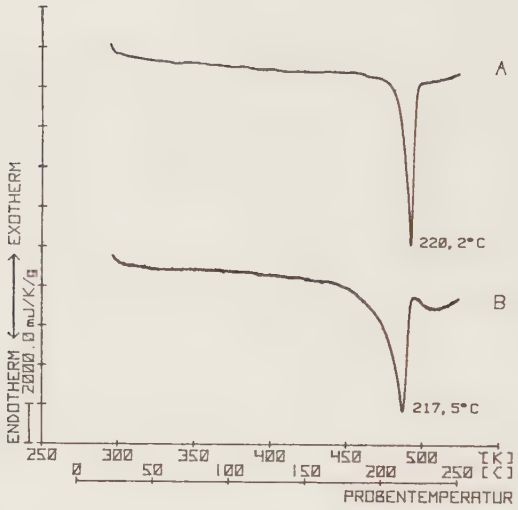


Abb. 48 DTA-Aufnahmen von Digoxigenin nach Kristallisation aus A) Acetonitril B) Dimethylformamid

Auch Röntgendiffraktogramme weisen einen von dem des Hydrats abweichenden Verlauf auf, was in Abbildung 49 deutlich wird.

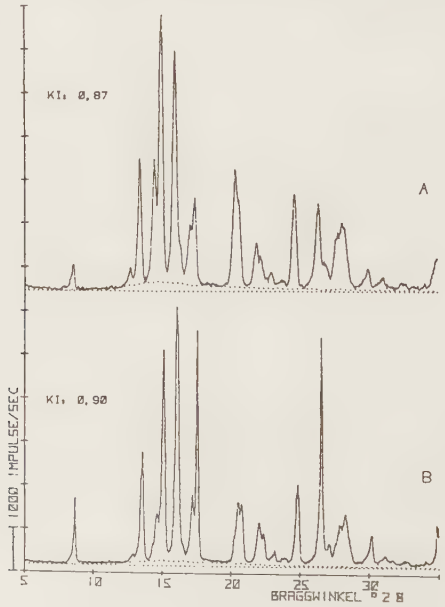


Abb. 49 Röntgendiffraktogramme von Digoxigenin nach Kristallisation aus A) Acetonitril B) Dimethylformamid

Diese Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß auf dem beschriebenen Wege die Reindarstellung der höher schmelzenden Modifikation des Digoxigenins gelungen ist, die bisher nur thermotrop zugänglich war.

5.2.4. Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Kristallisationsversuchen

- Eine Ausbildung von Solvaten mit den verwendeten Lösungsmitteln - wie von KUHNERT-BRANDSTÄTTER an einer Reihe von Steroiden beobachtet - konnte unter den genannten Bedingungen in keinem Fall festgestellt werden (15).
- Digoxigenin ist in apolaren Lösungsmitteln praktisch unlöslich. Nur mit Chloroform lassen sich 1proz. Lösungen herstellen. Beim Abdampfen des Lösungsmittels erhält man ein röntgenamorphes Produkt.
- Aus Methanol, Ethanol und Aceton kristallisiert unter den gleichen Bedingungen das Hydrat aus.
- Aus polaren aprotischen Lösungsmitteln mit einem relativ hohen Siedepunkt und minimalem Dampfdruck, wie Acetonitril und Dimethylformamid, kristallisiert eine wasserfreie Modifikation. Diese Kristallform weist einen Schmelzpunkt (493 K ≙ 220 ^{o}C) auf, der 10 K über dem des Hydrats liegt.

Durch dieses Resultat konnte bewiesen werden, daß eine bisher nur thermotrop zugängliche Modifikation auch durch Auskristallisation erhalten werden kann.

Nach dem Vorschlag von KOFLER werden die Modifikationen im Folgenden mit römischen Ziffern bezeichnet. Die Modifikation mit dem höchsten Schmelzpunkt wird - unabhängig von ihrer Beständigkeit bei Raumtemperatur - mit I und die weiteren Modifikationen nach sinkenden Schmelzpunkten mit steigenden römischen Ziffern belegt (129).

Die neu dargestellte Modifikation, die bei 493 K (220 °C) schmilzt, wird folglich mit I, und diejenige, die bei 483 K (210 °C) schmilzt, mit II bezeichnet. Durch die ausgeprägte Wasserbindungstendenz liegt diese Modifikation bei Raumtemperatur und durchschnittlicher Luftfeuchte als Monohydrat vor.

In den folgenden Abschnitten soll nun auf das unterschiedliche Verhalten und die thermodynamische Stabilität der zwei Modifikationen eingegangen werden.

5.3. Untersuchungen zum Auflösungsverhalten

Das Problem, daß polymorphe Modifikationen einer Substanz Unterschiede in der Löslichkeit aufweisen, spielt in der galenischen Praxis eine bedeutende Rolle bei der Neuentwicklung von Arzneimitteln (119,120). So wurden bei Löslichkeitsuntersuchungen an polymorphen Modifikationen von Methylprednisolon (121-123) und Sulfathiazol (124-126) signifikante Unterschiede festgestellt.

Aus diesem Grunde sind entsprechende Untersuchungen auch an den beiden Digoxigeninmodifikationen I und II angezeigt. Es scheint legitim, das Hydrat der Modifikation II mit der höher schmelzenden wasserfreien Modifikation I zu vergleichen, da es sich in beiden Fällen um bei Raumtemperatur beständige Formen handelt.

Unter 3.4.2., S. 48 , wurde schon festgestellt, daß sich das Hydrat durch die Wasserabgabe in keine andere Kristallform umwandelt: So weisen das Hydrat und das Anhydrat das gleiche Reflexmuster bei der Röntgendiffraktometrie auf. Auch in DTA-Kurven sind keine Auslenkungen zu erkennen, die auf eine Umwandlung hinweisen würden.

Zum Vergleich soll auch das Auflösungsverhalten der amorphen Form dargestellt werden. Naturgemäß ist die Sättigungslöslichkeit amorpher Phasen oft erheblich höher als die der kristallinen, da sie als unterkühlte Schmelzen keine Gitterenergie aufweisen, die sich dem Auflösungsvorgang zusätzlich hindernd entgegenstellt (127).

Im Folgenden werden nun zunächst Untersuchungen zur Sättigungslöslichkeit und dann zur Auflösungsgeschwindigkeit dargestellt.

5.3.1. Theoretische Bedeutung der Sättigungslöslichkeit

Die Bestimmung der Löslichkeiten verschiedener Modifikationen hat nicht nur Bedeutung für die Praxis, sondern dient auch der Ermittlung der thermodynamischen Beziehungen, die zwischen verschiedenen Kristallformen herrschen. KUHNERT-BRANDSTÄTTER leitete die folgende Gleichung ab, die einen Zusammenhang zwischen dem Löslichkeitsunterschied und der Umwandlungsenthalpie zweier gegebener Modifikationen herstellt (127).

$$\Delta H_{I,II} = \Delta H_{II} - \Delta H_{I} = RT^2 \frac{d\ln \frac{C_{s_{II}}}{C_{s_{I}}}}{dT} \qquad \text{(Gl. 3)}$$

$\Delta H_{I,II}$	Umwandlungsenergie
ΔH_{II}	Lösungsenthalpie der Modifikation II
ΔH_{I}	Lösungsenthalpie der Modifikation I
R	allgemeine Gaskonstante
T	absolute Temperatur
$C_{s_{II}}$	Sättigungslöslichkeit der Modifikation II
$C_{s_{I}}$	Sättigungslöslichkeit der Modifikation I

Aus der Gleichung ist zu erkennen, daß die relative Löslichkeitsdifferenz zweier polymorpher Modifikationen unabhängig von der Natur des Lösungsmittels ist, wenn es sich um eine ideale Lösung handelt. Dies konnte verschiedentlich experimentell bestätigt werden (121,122,128).

Die Umwandlungsenergie $\Delta H_{I,II}$ stellt einen Energiesprung dar, der ein positives Vorzeichen trägt, wenn sich mit steigender Temperatur die Modifikation II in I umwandelt. Die bei hoher Temperatur stabile Modifikation I hat nämlich bei gleicher Temperatur die größere Entropie verglichen mit der Modifikation II.

5.3.2. Bestimmung der Sättigungslöslichkeit

Bei der Bestimmung der Sättigungslöslichkeit in der Praxis muß beachtet werden, daß ein Gleichgewicht zwischen Lösung und Bodenkörper erreicht ist. Nicht selten tritt während des Auflösungsvorgangs eine polymorphe Umwandlung des Bodenkörpers ein, dessen Bestandteile ganz andere Lösungseigenschaften aufweisen. Der erhaltene Wert für die Sättigungslöslichkeit wäre dann verfälscht.

Um solche Vorgänge schon bei ihrer Entstehung erkennen zu können, wurden die Digoxigeninmodifikationen I und II mit Hilfe der auf der folgenden Abbildung dargestellten Freisetzungsapparatur untersucht.

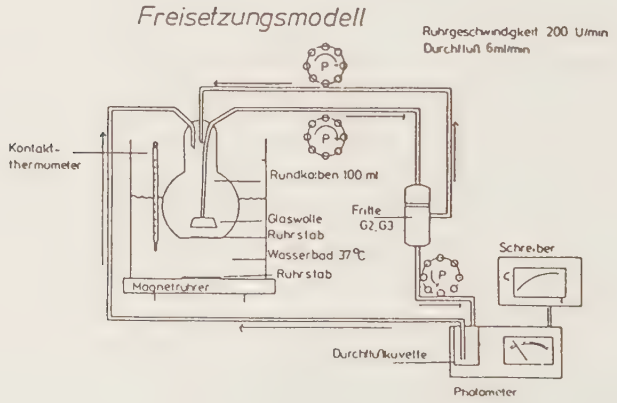


Abb. 50 Freisetzungsmodell zur Bestimmung der Sättigungslöslichkeit

Die nachstehende Tabelle enthält die genauen Versuchsbedingungen:

Tabelle 21 Versuchsbedingungen zur Bestimmung der Sättigungslöslichkeit

Inkubationsmedium	100 ml Wasser
Einwaage	100 mg Digoxigenin I, II bzw. amorph
Rührgeschwindigkeit	200 U/min
Durchfluß	6 ml/min
Temperatur	310 K (37 °C)
Konzentrationsmessung	photometrisch bei 220 nm
spezifische Extinktion $E^{1\%}_{1cm}$	353,3

Diese Versuchsanordnung hat den Vorteil, daß bei der Untersuchung amorpher Produkte eventuell auftretende Kristallisationsvorgänge zeitlich gut festgehalten werden können. Die maximal erreichbaren Konzentrationen lassen sich ebenfalls exakt ablesen.

Für die Bestimmungen wurden ausschließlich frisch hergestellte Produkte verwendet um lagerungsbedingte Substanzänderungen ausschließen zu können.

Aus der folgenden Abbildung 51, S. 114, sind die erhaltenen Freisetzungskurven zu entnehmen. Die ermittelten Sättigungslöslichkeiten der Modifikationen I und II (Hydrat) bzw. die vom amorphen Produkt erreichte Konzentration sind ebenfalls aufgeführt.

Unter den gewählten Bedingungen war bei Modifikation II (Hydrat) nach 20 Minuten, bei Modifikation I nach 8 Minuten 90 % und nach 6 Stunden 100 % Sättigung erreicht, d.h. es war kein Konzentrationsanstieg mehr zu beobachten. In einem Zeitraum von 24 Stunden war keine Abnahme bei der besser löslichen Kristallform (I) zu beobachten, was auf eine Umwandlung hingewiesen hätte. Die Modifikation I weist eine um 11,6 % höhere Sättigungslöslichkeit auf als die Modifikation II (Hydrat).

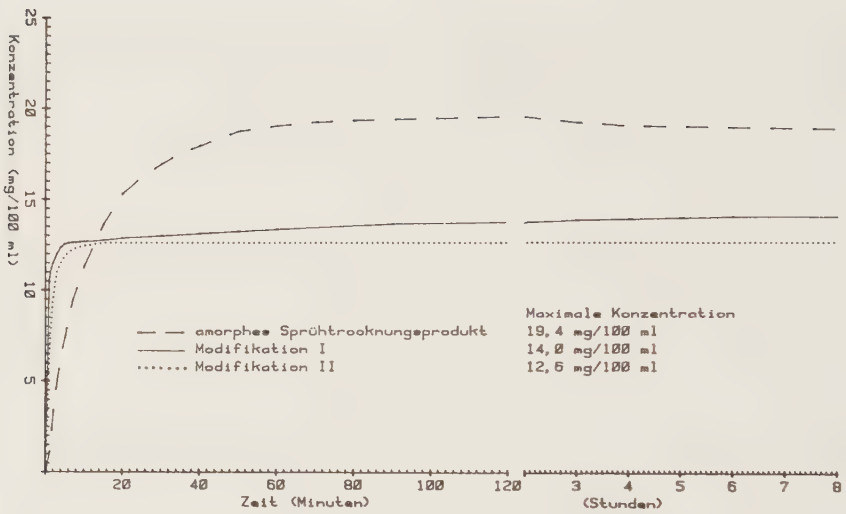


Abb. 51 Freisetzungskurven verschiedener Zustandsformen des Digoxigenins

Auffällig am sprühgetrockneten amorphen Produkt war der langsame Konzentrationsanstieg. Die Ursache für die geringe Lösungsgeschwindigkeit bestand in einer ausgeprägten Aerophilie, die unter den gewählten apparativen Bedingungen nicht zu verhindern war. Der maximale Konzentrationswert lag aber trotzdem etwa 55 % über dem der Modifikation I.

Nach Erreichen dieses Werts, was nach etwa 2 Stunden der Fall war, setzte langsame Rekristallisation ein, die sich im leichten Abfallen der Kurve bemerkbar machte. Dieses Verhalten gleicht somit dem von sprühgetrocknetem Griseofulvin, unterscheidet sich aber deutlich von dem des sprühgetrockneten Glykosids (Digoxin) (130,131).

Anhand der aufgezeichneten Kurven lassen sich auch Aussagen über die Lösungsgeschwindigkeit machen. Für eine exakte Bestimmung sind jedoch weitere Untersuchungen erforderlich, die in den folgenden Abschnitten dargestellt werden.

5.3.3. Bemerkungen zur Theorie der Auflösungsgeschwindigkeit

Bei der Bestimmung der Sättigungslöslichkeit polymorpher Modifikationen treten, wie schon angedeutet, häufig Schwierigkeiten auf, weil sich die besser löslichen während der Messung in weniger gut lösliche umwandeln. Falls es aber gelingt, die Auflösungsgeschwindigkeiten der verschiedenen Phasen zu bestimmen, können Löslichkeitsunterschiede trotz Umwandlung ermittelt werden. Dies ist in der Regel möglich, da es für die Bestimmung genügt die Substanz nur wenige Minuten dem Lösungsmittel auszusetzen (127).

Die Auflösungsgeschwindigkeit wird durch die von NERNST und BRUNNER formulierte Gleichung beschrieben (132,133). Sie basiert auf dem bekannten FICK'schen Gesetz und den Vorstellungen von NOYES und WHITNEY, die als erste die Auflösungsgeschwindigkeit in quantitativer Form beschrieben haben (134,135).

Die Gleichung, die von einem durch Diffusion gesteuerten Auflösungsprozeß ausgeht, lautet folgendermaßen:

$$\frac{dC}{dt} = \frac{DF}{hV} \cdot (C_o - C_t)\, K \qquad \text{(Gl. 4)}$$

dC/dt	Auflösungsgeschwindigkeit
D	Diffusionskoeffizient
h	Dicke der Diffusionsschicht
F	dem Lösungsmittel ausgesetzte geometrische Oberfläche der Festkörpersubstanz
C_o	Konzentration der Lösung an der Phasengrenze; wenn die Abdiffusion des Gelösten vollständig die Auflösungsgeschwindigkeit steuert, entspricht sie der Sättigungslöslichkeit C_s
C_t	Konzentration der Hauptmenge der Lösung zur Zeit t
K	Apparatekonstante
V	Volumen des Lösungsmittels

Gemäß Gleichung 4 ist die Auflösungsgeschwindigkeit eine Funktion verschiedener Faktoren. Wenn diese beim Experiment konstant gehalten werden, läßt sich diese Gleichung in der folgenden vereinfachten Form (Gleichung 5) darstellen:

$$\frac{dC}{dt} = k' (C_s - C_t) \qquad \text{(Gl. 5)}$$

Wenn darauf geachtet wird, daß C_t im Konzentrationsgradienten (C_s-C_t) gegenüber C_s so klein gehalten wird, daß es vernachlässigt werden kann, gilt:

$$\frac{dC}{dt} = k' C_s = k'' \qquad \text{(Gl. 6)}$$

Nach dem Integrieren erhält man folgende Geradenfunktion:

$$C = k'' \cdot t \qquad \text{(Gl. 7)}$$

Daraus ist ersichtlich, daß die Auflösungsgeschwindigkeit unter den genannten Bedingungen eine lineare Abhängigkeit der Konzentration von der Zeit darstellt.

5.3.4. Bestimmung der Auflösungsgeschwindigkeit (Intrinsic Dissolution Rate)

Die Auflösungsgeschwindigkeit bei konstanter Oberfläche wird auch als "Intrinsic Dissolution Rate" bezeichnet (45). Experimentell wurde sie mit Hilfe der unter 5.3.2., S. 112, vorgestellten kontinuierlich und automatisch die Konzentration messenden Versuchsanordnung bestimmt. Um der NERNST-BRUNNER-Gleichung (vgl. Gl. 4, S. 115) zu genügen, wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- Die Wirkstoffmenge von 100 mg wurde in einer nur einseitig offenen Acrylglasmatrize (Ø 7 mm) zu einer Scheibe verpreßt, um die Substanzoberfläche (0,3848 cm²) konstant zu halten.
- Die Scheibenfläche wurde genau gegen die Strömung der konstant gerührten Flüssigkeit fixiert, um konstante Diffusionsverhältnisse zu erhalten.
- Das Volumen des Inkubationsmediums wurde auf 500 ml erhöht, um die Konzentration der Lösung zum Zeitpunkt t (C_t) klein zu halten.

Die folgende Abbildung zeigt den geänderten Versuchsaufbau:

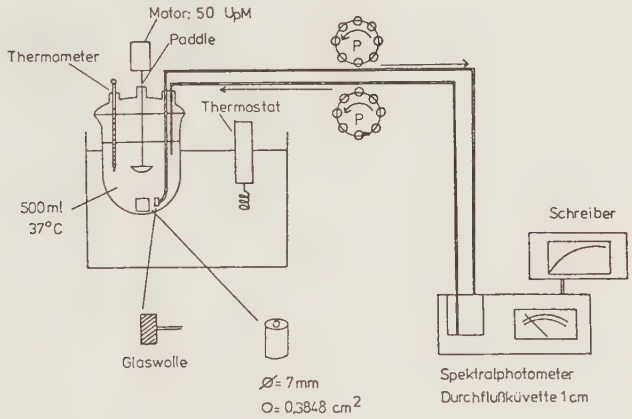


Abb. 52 Freisetzungsmodell zur Bestimmung der Auflösungsgeschwindigkeit

Ähnliche Anordnungen sind auch von KUHNERT-BRANDSTÄTTER, NIEBERGALL et al. und HOPP beschrieben (96,136,137).

Die Versuchsbedingungen sind in nachfolgender Tabelle 22 dargestellt.

Tabelle 22 Versuchsbedingungen zur Bestimmung der Auflösungsgeschwindigkeit

Inkubationsmedium	500 ml Wasser
Einwaage	100 mg Digoxigenin I, II bzw. amorph
Preßling	Ø 7 mm, Oberfläche 0,3848 cm²
Rührgeschwindigkeit	50 U/min
Durchflußrate	10 ml/min
Temperatur	310 K (37 °C)
Konzentrationsbestimmung	photometrisch bei 220 nm
spez. Extinktion $E^{1\%}_{1cm}$	335,3

In der folgenden graphischen Darstellung sind die für die Modifikationen I und II sowie das amorphe Produkt erhaltenen Geraden dargestellt.

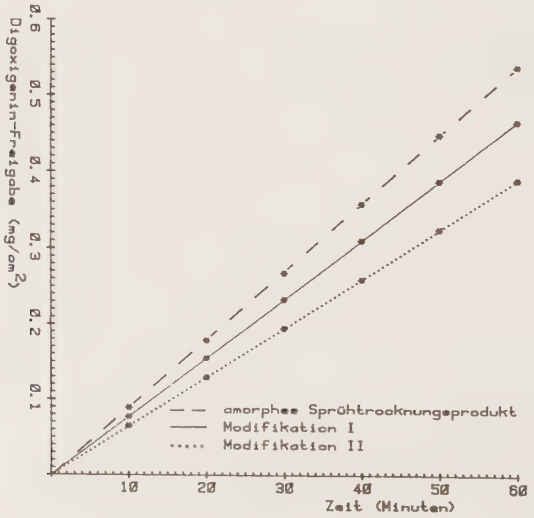


Abb. 53 Bestimmung der Auflösungsgeschwindigkeit verschiedener Zustandsformen des Digoxigenins

Erwartungsgemäß weist die Gerade des amorphen Produkts die größte Steigung auf. Die bei der Pulverfreisetzung (vgl. 5.3.2., S. 112) festgestellten Aerophilie-Erscheinungen kommen hier also nicht zum Tragen. Bei Modifikation II erfolgt die Auflösung am langsamsten.

Für die quantitative Beschreibung der Auflösungsgeschwindigkeit bei definierter Oberfläche gilt die folgende Beziehung:

$$AG = \frac{Ke \cdot V}{100 \cdot E_{1cm}^{1\%} \cdot (d/2)^2 \cdot \pi} \left[mg \cdot cm^{-2} \cdot min^{-1} \right] \quad \text{(Gl. 8)}$$

AG	Auflösungsgeschwindigkeit
Ke	Extinktionszunahme pro Minute bei einer Schichtdicke von 1 cm
V	Volumen des Lösungsmittels
$E_{1cm}^{1\%}$	Spezifische Extinktion 335,3
d	Durchmesser der dem Lösungsmittel ausgesetzten Scheibenfläche: 7 mm

Nach der Berechnung wurden folgende Werte erhalten:

Modifikation I : $7{,}6 \cdot 10^{-3}$ mg $\cdot$ cm^{-2} $\cdot$ min^{-1}

Modifikation II: $6{,}5 \cdot 10^{-3}$ mg $\cdot$ cm^{-2} $\cdot$ min^{-1}

amorphe Form : $8{,}9 \cdot 10^{-3}$ mg $\cdot$ cm^{-2} $\cdot$ min^{-1}

Im folgenden Abschnitt sind die Ergebnisse der einzelnen Lösungsversuche zusammengefaßt:

5.3.5. Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Ergebnisse der Untersuchungen zum Auflösungsverhalten lassen sich wie folgt zusammenfassen:

Die Modifikation I (Fp. 493 K ≙ 220 °C) weist eine etwas höhere Sättigungslöslichkeit und eine höhere Auflösungsgeschwindigkeit (Intrinsic Dissolution Rate) auf als die Modifikation II (Fp. 483 K ≙ 210 °C). Dieses Resultat deckt sich mit den Angaben von KUHNERT-BRANDSTÄTTER et al., wonach die Modifikationen mit dem höheren Schmelzpunkt auch eine größere Löslichkeit aufweisen (127). Dieser Unterschied darf deshalb als weiterer Beweis für die tatsächliche Existenz einer zweiten Modifikation gewertet werden.

Während der Dauer der Messungen konnte keine Umwandlung der Modifikation I in II (Hydrat) beobachtet werden. Ungelöste Kristalle der Modifikation I allerdings, die nach 36 Stunden aus dem Inkubationsmedium entnommen wurden, zeigten nach Lufttrocknung in der DTA den folgenden DTA-Kurvenverlauf:

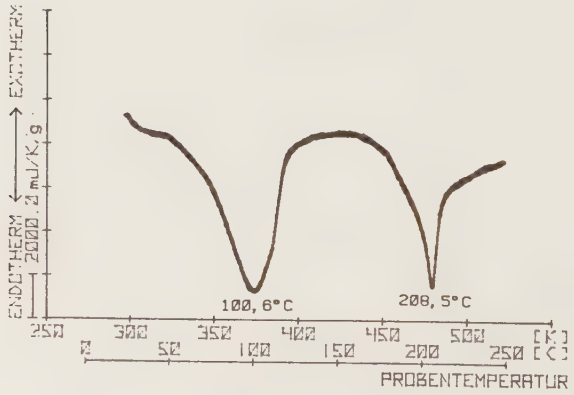


Abb. 54 DTA-Aufnahme von Digoxigenin I nach 96-stündiger Inkubation in Wasser und anschließendem Trocknen

Anhand der Maxima ist deutlich zu erkennen, daß sich quantitativ die Modifikation II, das Digoxigeninmonohydrat, gebildet hat.

Die gleiche Umwandlung erfährt auch das amorphe Digoxigenin, wenn es bei der Inkubation in Wasser rekristallisiert.

Im übrigen zeigte das amorphe Digoxigenin erwartungsgemäß bessere Lösungseigenschaften als die kristallinen Modifikationen, was in einer Obersättigungsrate von ca. 50 % zum Ausdruck kommt. Dieser Wert liegt aber deutlich unter den Obersättigungsraten von 500 %, die bei amorphem Digoxin erreicht werden (46).

Ein weiteres Unterscheidungskriterium bei der Polymorphieforschung ist in vielen Fällen durch die IR-Spektren der verschiedenen Modifikationen gegeben. Auf entsprechende Untersuchungen wird im folgenden Abschnitt näher eingegangen.

5.4. IR-Untersuchungen

Wenn sich in der dreidimensionalen periodischen Anordnung des Gitters Veränderungen ergeben, kann dies in unterschiedlichen IR-Spektren zum Ausdruck kommen.

Es gibt aber auch Fälle, in denen verschiedene Modifikationen das gleiche IR-Spektrum aufweisen. Beispiele hierfür sind Modifikation II, III und IV von Chloramphenicolpalmitat (138) oder Modifikationen von Propyphenazon (139), Aminophenazon (139) und Menadion (140).

Beim Vergleich der folgenden Abbildung, die das IR-Spektrum der Modifikation I enthält, mit den Spektren des Hydrats und Anhydrats (vgl. 3.5., S. 50) stellt man fest, daß keine gravierende Veränderung eingetreten ist: die Spektren unterscheiden sich lediglich im Bereich der OH-Valenzschwingungen bei den Wellenzahlen 3400 bis 3600.

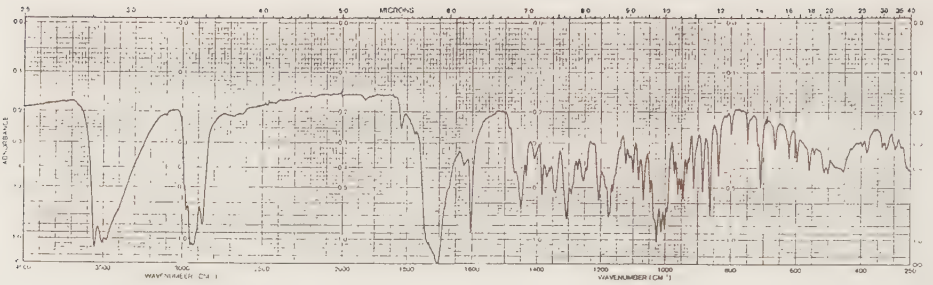


Abb. 55 IR-Spektrum der Digoxigenin-Modifikation I (in KBr)

Nach BURGER kann man deutliche Unterschiede dann feststellen, wenn ein Mehrfaches der sonst üblichen Probenmengen (0,6 bis 1 mg) mit KBr präpariert wird (63). Dies führte aber auch zu keiner Verbesserung, so daß im vorliegenden Fall des Digoxigenins nach einem weiteren geeigneten Unterscheidungskriterium der polymorphen Modifikationen gesucht werden mußte.

Ein solches besteht in der Bestimmung der Schmelzenthalpien der Modifikationen I und II. Derartige Messungen sind grundsätzlich mit der DTA möglich.

Die im folgenden Abschnitt dargestellten Untersuchungen wurden jedoch mittels Differential Scanning Calorimetry (DSC) durchgeführt, da diese Methode die direkte quantitative Erfassung von Enthalpie-Effekten ermöglicht.

5.5. Bestimmung der Schmelzenthalpie mittels DSC

Bei der DSC jedoch können die umgesetzten Energiebeträge ΔH direkt registriert werden, weil ein zusätzlicher Steuermechanismus die Temperaturdifferenz zwischen Probe und Referenz durch verstärkte bzw. verminderte E n e r g i e z u f u h r , die separat registriert wird, ausgleicht. Die Peakhöhe auf der DSC-Kurve ist ein direktes Maß für die maximale Leistungsdifferenz.

Die folgenden DSC-Kurven zeigen den jeweiligen Schmelzbereich der beiden Digoxigeninmodifikationen.

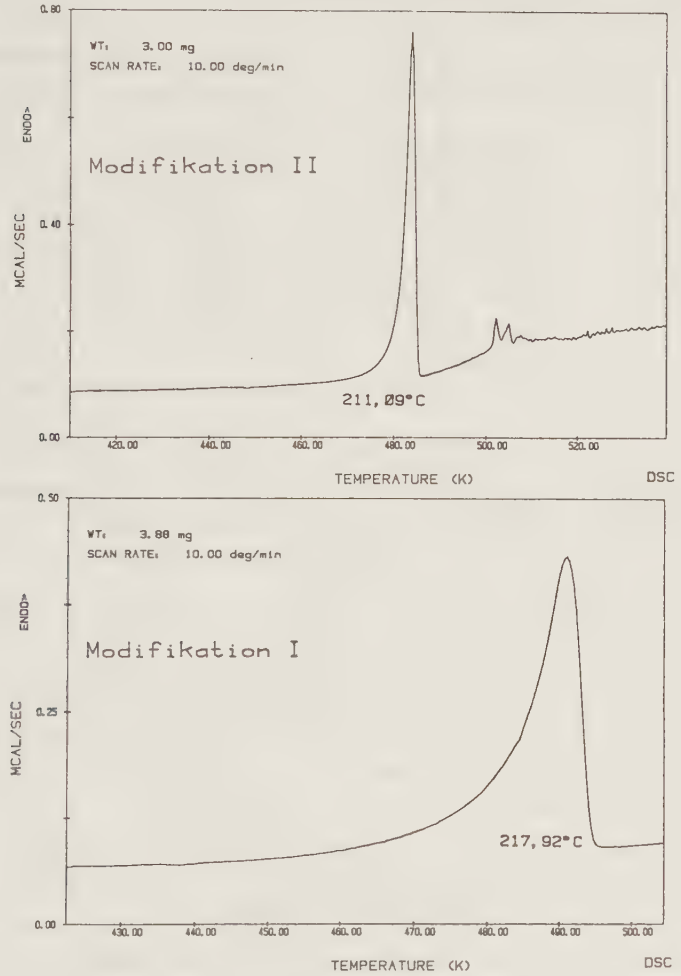


Abb. 56 DSC-Aufnahmen der Digoxigenin-Modifikationen I und II

Es fällt auf, daß sich der endotherme Vorgang des Schmelzens - im Gegensatz zur DTA - als Auslenkung oberhalb der Basislinie äußert. Die folgende Tabelle faßt die Ergebnisse der Kurven und die Versuchsparameter zusammen:

Tabelle 23 Versuchsergebnisse der DSC-Messungen

	Modifikation I	Modifikation II
Peakbeginn	438,26 K (165,26 °C)	414,86 K (141,86 °C)
Peakende	496,50 K (223,50 °C)	448,75 K (175,75 °C)
Peakmaximum	490,92 K (217,92 °C)	484,09 K (211,09 °C)
Schmelzenthalpie	49,26 J/g (11,77 cal/g)	85,76 J/g (20,49 cal/g)
Einwaage	3,88 mg	3,00 mg
Heizrate	10 K/min	10 K/min

Nach BURGER ist es möglich mit Hilfe der quantitativ registrierten Enthalpieeffekte gewisse Rückschlüsse auf die thermodynamische Stabilität polymorpher Modifikationen zu ziehen. Er entwikkelte die sogenannte Schmelzwärmeregel, die Folgendes besagt:

Wenn von zwei Modifikationen diejenige mit dem höheren Schmelzpunkt die niedrigere Schmelzwärme aufweist, sind die beiden Modifikationen gewöhnlich enantiotrop, d.h. wechselseitig ineinander umwandelbar. Falls die Modifikation mit dem höheren Schmelzpunkt auch die höhere Schmelzwärme aufweist, sind sie monotrop, d.h. die niedriger schmelzende Modifikation läßt sich in die höher schmelzende umwandeln, aber nicht umgekehrt (63).

Angewendet auf die Ergebnisse, die für Digoxigenin erhalten wurden, würde dies bedeuten, daß sich die beiden Modifikationen e n a n t i o t r o p zueinander verhalten.

Auf diese Fragestellung - Monotropie oder Enantiotropie - soll in den folgenden Abschnitten näher eingegangen werden.

5.6. Thermodynamische Aspekte der Polymorphie

Die Modifikationen einer Substanz zeichnen sich im allgemeinen durch Stabilitätsunterschiede aus. So ist bei Raumtemperatur nur die mit der geringsten freien Energie stabil, während die andere mehr oder weniger instabil ist. Zur Frage der Stabilität kommt noch die Einteilung in monotrop und enantiotrop (186,187).

Da die Resultate der DSC-Messungen auf eine Enantiotropie hinweisen, soll auf diesen Begriff im Folgenden eingegangen werden.

5.6.1. Theorie der Enantiotropie

Im enantiotropen System schneiden sich die Dampfdruckkurven der Modifikationen I und II, bevor sie die der Schmelze jeweils schneiden (vgl. Abb. 57).

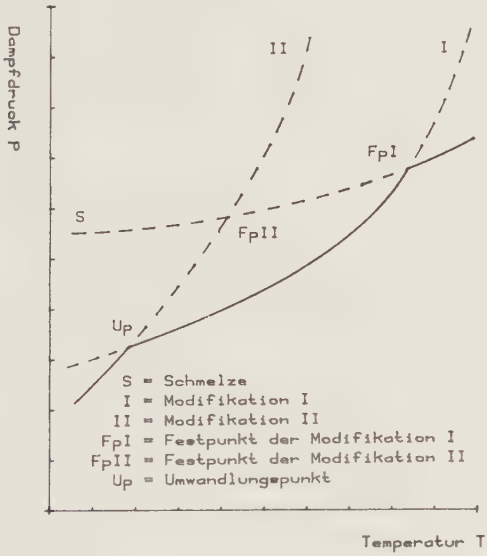


Abb. 57 Schematische Darstellung eines enantiotropen Systems

Unterhalb des Schnittpunkts der Dampfdruckkurven (UP) ist die Modifikation II stabil, oberhalb aber die Modifikation I. Im Schnittpunkt stehen die beiden kristallinen Phasen miteinander im thermodynamischen Gleichgewicht, d.h. sie können nebeneinander existieren. Erst beim entsprechenden Unter- oder Oberschreiten der Temperatur des sogenannten Umwandlungspunkts (UP) kommt es zur Umwandlung. Aus diesem Grund wird die im unteren Temperaturbereich stabile Form "Tieftemperaturform" und die höher schmelzende "Hochtemperaturform" genannt (14).

Im Falle der Monotropie wird Modifikation II irreversibel in Modifikation I umgewandelt; der umgekehrte Weg ist ausgeschlossen.

Im Folgenden sollen nun diese theoretischen Oberlegungen mit den Ergebnissen praktischer Versuche verglichen werden.

5.6.2. Variation der Aufheizgeschwindigkeit in der DTA

Bei den DTA-Untersuchungen teilamorpher Produkte (vgl. Abb. 40,S.91) waren Vorgänge beobachtet worden, die als Umwandlung der niedriger schmelzenden in die höher schmelzende Form gedeutet wurden (ca. 488 K ≙ 215 °C). Beim reinen Hydrat (vgl. 3., S. 26) konnte eine solche Erscheinung aber nicht festgestellt werden. Die Aufheizrate betrug bei den genannten Versuchen 5 K/min.

Es stellte sich nun die Frage, was eine Erhöhung bzw. vor allem, was eine Erniedrigung der Aufheizrate bei der reinen Modifikation II bewirken würde. Die folgende Abbildung faßt DTA-Kurven von Proben, die mit 1, 2, 5 und 10 K/min aufgeheizt wurden, zusammen. Im Gegensatz zu den bisher gezeigten Kurven wird nur der Ausschnitt dargestellt, der um den Schmelzbereich liegt (460 - 530 K ≙ 187 - 257 °C). Durch diese Spreizung können gegenüber Abbildung 9 (S. 27) feine Veränderungen deutlicher gemacht werden.

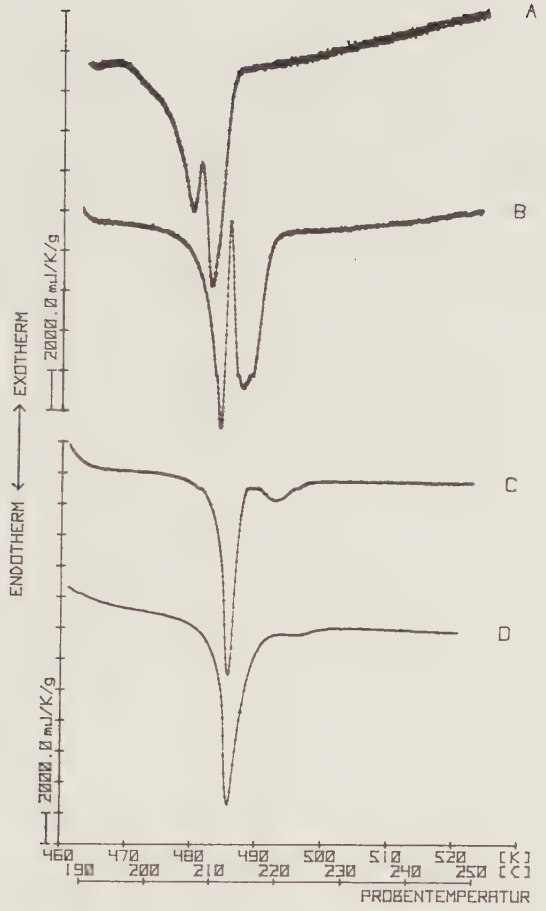


Abb. 58 DTA-Aufnahmen von Digoxigenin-Modifikation II mit unterschiedlichen Aufheizraten

A) 1 K/min
B) 2 K/min
C) 5 K/min
D) 10 K/min

Zwei Effekte fallen ins Auge:

Bei der gewöhnlich eingesetzten Aufheizrate von 5 K/min ist ein deutlicher endothermer Peak bei 485,8 K (212,8 °C) zu erkennen, der das Schmelzen der Substanz anzeigt. Durch die Spreizung der Kurve tritt aber noch ein kleinerer endothermer Peak bei 493,0 K (220 °C) in Erscheinung. Dieser Peak wird bei abnehmenden Heizraten (2 bzw. 1 K/min) zunehmend größer und der erste dafür immer kleiner. Bei einer größeren Aufheizgeschwindigkeit (10 K/min) äußert er sich nur noch als schwache Auslenkung von der Basislinie.

Dieses Ergebnis erhärtet die Deutung, wonach beim Auftreten der niedriger schmelzenden Substanz (Modifikation II) eine thermotrope Umwandlung in Modifikation I stattfindet. Bei einer Aufheizrate von 5 K/min allerdings (vgl. 4.6., S. 101) war dieses Phänomen bisher nur dann deutlich in Erscheinung getreten, wenn Impfkristalle der höher schmelzenden Modifikation I anwesend waren. Dieser Versuch macht aber deutlich, daß die Umwandlung auch ohne Impfkristalle stattfindet, wenn nur genügend langsam aufgeheizt wird.

Der zweite Effekt ist in der Literatur beschrieben (79). Bei zunehmender Aufheizgeschwindigkeit verlagern sich die Maxima thermischer Reaktionen zu höheren Werten.

In der folgenden Tabelle sind die Peakmaxima mit den zugehörigen Aufheizraten zusammengefaßt:

Tabelle 24 Verschiebung der DTA-Peaks in Abhängigkeit von der Aufheizrate

Aufheizrate	1. Peak	2. Peak
1 K/min	480,0 K (207,0 °C)	483,0 K (210,0 °C)
2 K/min	484,5 K (211,5 °C)	488,0 K (215,0 °C)
5 K/min	485,8 K (212,8 °C)	493,0 K (220,0 °C)
10 K/min	486,0 K (213,0 °C)	-

Diese Ergebnisse liefern nun auch eine Erklärung dafür, daß die Literaturangaben zum Schmelzpunkt des Digoxigenins differieren (vgl. 2.2., S. 14). Möglicherweise wurde bei der Schmelzpunktsbestimmung mit von Autor zu Autor verschiedenen Aufheizgeschwindigkeiten gearbeitet und die Umwandlung der Modifikation II in I als solche nicht erkannt. Genaue Angaben zur Heizrate wurden jedenfalls von keinem gemacht.

Eine weitere Möglichkeit besteht darin, daß Modifikationsgemische untersucht wurden, ohne daß dies bekannt war.

Bei den bisher geschilderten DTA-Untersuchungen war die höher schmelzende Modifikation I immer erst thermotrop während des Aufheizens entstanden: Sie kristallisierte zum einen aus den amorphen Anteilen, wie in Kapitel 4 (S. 56) beschrieben, oder bildete sich in Abhängigkeit von der Aufheizrate aus Modifikation II, wie in diesem Abschnitt dargestellt.

Nachdem es gelungen war beide Modifikationen in reiner Form darzustellen, eröffnete sich die Möglichkeit mit definierten Mischungen eine experimentelle Überprüfung des dargelegten Sachverhalts vorzunehmen.

5.6.3. DTA-Untersuchungen von Modifikationsmischungen

Für die DTA-Untersuchungen von Mischungen der frisch hergestellten kristallinen Modifikationen I und II wurden die in der nachstehenden Tabelle zusammengefaßten Verhältnisse gewählt.

Das Vermischen der zwei Kristallfraktionen wurde sehr vorsichtig durchgeführt, um eine mechanische Belastung der Kristalle zu vermeiden. Diese hätte möglicherweise zur Ausbildung amorpher Anteile geführt, die im Zuge des Aufheizens bei der DTA rekristallisiert wären und dadurch das Ergebnis verfälscht hätten.

Tabelle 25 Mengenverhältnisse der untersuchten Modifikationsmischungen

Versuch	Einwaagen pro Analyse von Mod. I	Mod. II	Gew.Verh. I : II	Mol.Verh. I : II
A	2,110 mg	0,920 mg	I : 0,44	I : 0,46
B	1,369 mg	1,781 mg	I : 1,30	I : 1,36
C	0,648 mg	3,375 mg	I : 5,21	I : 5,45
D	0,088 mg	2,765 mg	I : 31,42	I : 32,87

Abbildung 59 gibt die DTA-Kurven der 4 Versuche wieder, die mit einer Aufheizgeschwindigkeit von 5 K/min durchgeführt wurden.

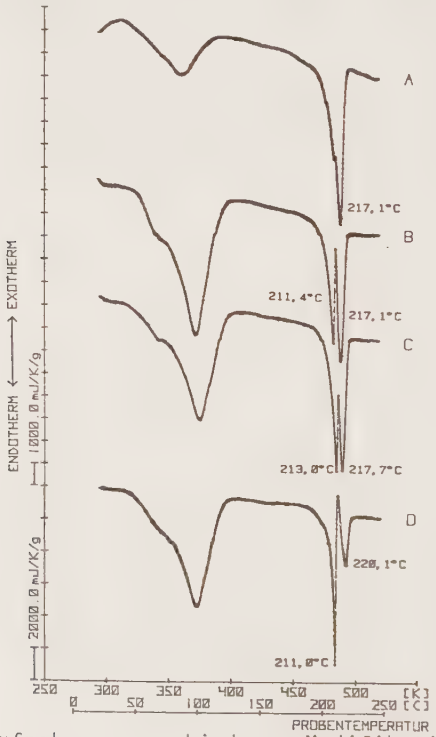


Abb. 59 DTA-Aufnahmen verschiedener Modifikationsmischungen gemäß Tabelle 25

Die Versuchsreihe bestätigte die in Kapitel 4 (S. 101) dargestellten Resultate. Auch die von vorneherein kristallin vorliegende Modifikation I fördert die Umwandlung von Modifikation II in I.

Wenn die Modifikation I mengenmäßig um etwa das Doppelte überwiegt (Versuch A), tritt Modifikation II nur als angedeutete Schulter in Erscheinung. Erhöht man den Anteil der Modifikation II gemäß Versuch B, so erkennt man die Schmelzsignale von beiden Modifikationen. Bei einem Verhältnis von 5 zu 1 (II/I) bei Versuch C sind die beiden Schmelzpeaks etwa gleich groß. Erst wenn Modifikation II 31fach überwiegt (Versuch D), ist die Umwandlung bei der gewählten Aufheizgeschwindigkeit so weit zurückgedrängt, daß der Schmelzpeak der Modifikation II stärker in Erscheinung tritt. Auch erst bei diesem Mischungsverhältnis ragt der Umwandlungspeak exotherm über die Basislinie hinaus.

Beim Vergleichen dieses Befunds mit den Resultaten, die an teilamorphen Produkten in Kapitel 4 gesammelt werden konnten, muß allerdings Folgendes berücksichtigt werden. Bei den oben geschilderten Versuchen lag eine physikalische Mischung aus relativ großen Kristallen (Ø ca. 80 µm) vor. Dagegen dürften bei der Rekristallisation amorpher Anteile in den teilamorphen Produkten weit kleinere Kristalle resultieren, die zudem einen innigeren Kontakt zu den Kristallen der Modifikation II aufweisen. Auf diese Weise genügen weitaus geringere Mengenanteile der Modifikation I um eine Umwandlung von II in I zu induzieren.

Bei den bisher durchgeführten Untersuchungen wurden immer frisch hergestellte Kristalle der Modifikation I eingesetzt. Im nächsten Abschnitt soll deshalb die Lagerstabilität dieser Modifikation untersucht werden.

5.6.4. Enantiotrope Umwandlung der Modifikation I

Nach den Gesetzen der Thermodynamik gibt es nur eine Form einer polymorphen Substanz, die bei Raumtemperatur stabil ist. Trotz der thermodynamischen Instabilität evtl. vorhandener anderer Modifikationen ist es möglich, daß auch diese Substanzen nahezu unbegrenzt beständig sind, sofern sie nicht z.B. großen Drücken oder dem Einfluß eines Lösungsmittels ausgesetzt werden. Diese Formen werden dann als metastabil bezeichnet (14).

Aufgrund der Tatsache, daß amorphes Digoxigenin in das Hydrat der Modifikation II übergeht und in dieser Gestalt auch noch nach einer Lagerdauer von zwei Jahren vorliegt (vgl. 4., S. 66) kann davon ausgegangen werden, daß es sich bei dieser Form um die bei Raumtemperatur thermodynamisch stabile handelt.

Die Ergebnisse der Schmelzwärmenbestimmung (vgl. 5.5., S. 122) gaben einen Hinweis auf das Vorliegen von Enantiotropie. Das würde bedeuten, daß sich die Kristalle der höher schmelzenden Form (Modifikation I) in II umwandeln müßten. (Der umgekehrte Weg wurde ja schon unter 5.2.3., S. 107, und 5.6.2., S. 126, dargestellt.

Zur Prüfung dieser Frage wurden frisch hergestellte Kristalle der Modifikation I in einem dicht verschlossenen Schraubglas im evakuierten Exsikkator bei Raumtemperatur gelagert.

Die folgende DTA-Kurve (Abb. 60, S. 133) zeigt, daß bereits nach 3 Monaten eine vollständige Umwandlung in das Anhydrat der Modifikation II stattfand.

Das Anhydrat seinerseits wandelte sich unter Einfluß der Luftfeuchtigkeit (vgl. 3.3.1., S. 42) in das stabile Hydrat um.

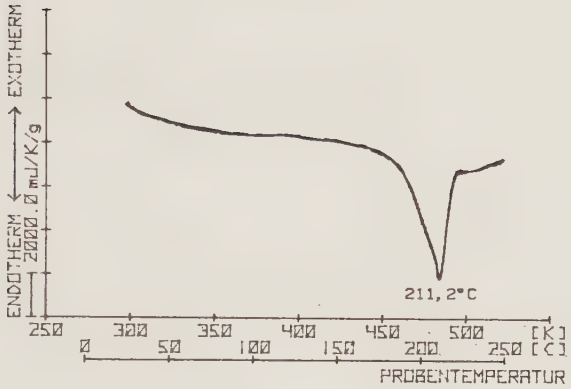


Abb. 60 DTA-Aufnahme von Modifikation I nach dreimonatiger Lagerung im evakuierten Exsikkator

Eine direkte Umwandlung ins Hydrat konnte beobachtet werden, wenn die Lagerung der Modifikation I in der Weise erfolgte, daß ein ungehinderter Zutritt der Umgebungsfeuchte aus der Raumluft möglich war. Die folgende Abbildung zeigt die DTA-Kurve eines solchen Umwandlungsprodukts, die zwei Monate nach Herstellung der Modifikation I aufgezeichnet wurde.

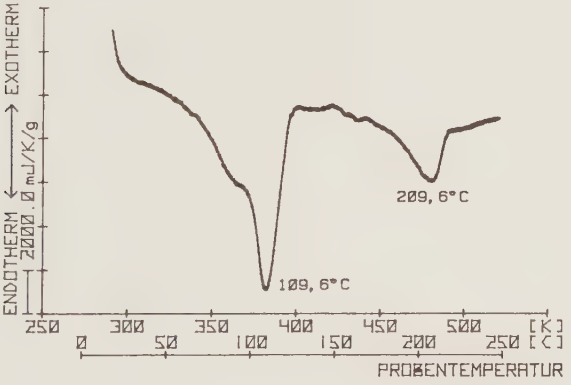


Abb. 61 DTA-Aufnahme von Modifikation I nach zweimonatiger Lagerung unter Einwirkung von Luftfeuchtigkeit

Bereits erwähnt wurde die noch schnellere Umwandlung des Bodenkörpers von Modifikation I in II bei den Löslichkeitsbestimmungen (vgl. 5.3.5., S. 120), die auf den direkten Kontakt mit Wasser zurückgeführt werden kann.

Die angeführten Beobachtungen b e s t ä t i g e n also den Sachverhalt der E n a n t i o t r o p i e . Wie unter 5.6.1., Seite 125, ausgeführt, muß folglich ein Umwandlungsprodukt existieren, bei dem die beiden Modifikationen miteinander im Gleichgewicht stehen.

Auf experimentelle Versuche diesen Punkt zu bestimmen wird deshalb im nächsten Abschnitt eingegangen.

5.6.5. Bestimmung des Umwandlungspunktes

Wie unter 5.6.1., S. 125, ausgeführt wurde, gibt es für zwei enantiotrope Modifikationen immer einen Umwandlungspunkt, d.h. einen Temperaturwert, bei dem sie im thermodynamischen Gleichgewicht stehen. Dieser Punkt kann durch quantitative Untersuchungen des Auflösungsverhaltens, d.h. der Bestimmung der temperaturabhängigen Sättigungslöslichkeit C_s genau festgelegt werden.

Im vorliegenden Fall wurden die verschiedenen Löslichkeitswerte in der Weise ermittelt, daß ein Überschuß Digoxigenin in Wasser bei steigenden Temperaturen jeweils so lange gerührt wurde bis kein Konzentrationsanstieg mehr zu verzeichnen war, was nach ca. 4 Stunden erreicht war. Dieses Verfahren ließ sich nicht nur auf Modifikation II, sondern auch auf Modifikation I anwenden, da innerhalb der Zeit bis Sättigung erreicht war, keine Kristallumwandlung stattfindet (vgl. 5.3.5., S. 120).

Die nachstehende Tabelle 26 faßt die Versuchsparameter zusammen:

Tabelle 26 Versuchsbedingungen zur Bestimmung des Umwandlungspunktes

Inkubationsmedium	100 ml Wasser
eingewogene Substanz	100 mg Digoxigenin
untersuchter Temperaturbereich	293 K - 338 K (20 °C - 65 °C)
Rührgeschwindigkeit	200 U/min
Konzentrationsbestimmung	photometrisch bei 220 nm

Aus den gewonnenen Wertepaaren resultieren bei der logarithmischen Auftragung der Sättigungslöslichkeiten gegen die reziproke Temperatur (van't Hoff-Diagramm) zwei Geraden, die durch die folgende allgemeine Beziehung beschrieben werden können (127):

$$k \cdot C_s = \frac{-\Delta H}{2{,}303 \cdot R} \qquad \text{(Gl. 9)}$$

k Konstante
C_s Sättigungslöslichkeit
ΔH Lösungsenthalpie
R allgemeine Gaskonstante

Diese Beziehung gilt, wenn die Lösungsenthalpie temperaturunabhängig konstant bleibt und sich die Lösungen ideal verhalten (vgl. 5.3.1., S. 111).

In der folgenden Abbildung sind die ermittelten Geraden eingetragen.

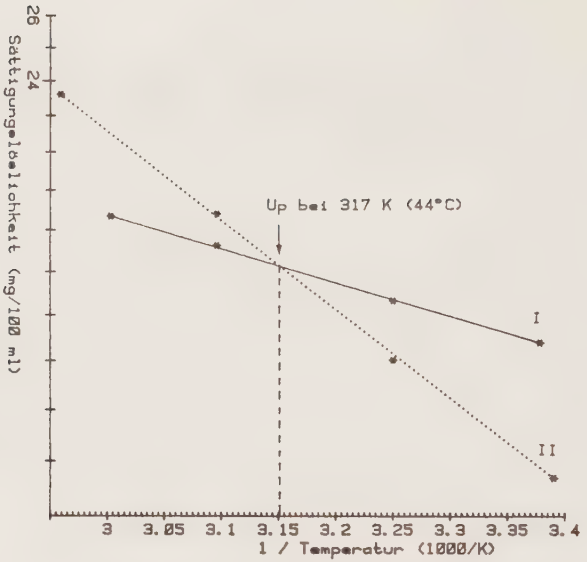


Abb. 62 Van't Hoff-Diagramm: Sättigungslöslichkeiten der Modifikationen I und II bei verschiedenen Temperaturen

Der aus dem Schnittpunkt der beiden Geraden resultierende Temperaturwert stellt den U m w a n d l u n g s p u n k t der beiden Modifikationen dar. Man erkennt, daß Modifikation I unterhalb dieses Werts besser löslich ist als II, oberhalb aber Modifikation II. Der Wert beträgt für Digoxigenin 317 K (44 ^{o}C).

Der ermittelte Wert für den Umwandlungspunkt steht scheinbar im Widerspruch zu dem in Kapitel 4 differentialthermoanalytisch bestimmten, der sich in einem exothermen Peak bei etwa 488 K (215 ^{o}C) äußert. Bei einer Interpretation muß der folgende Sachverhalt beachtet werden.

Die Umwandlung erfolgt bei organischen Stoffen nicht schlagartig, sondern sie erreicht erst beim entsprechenden Überschreiten der Temperatur des Umwandlungspunktes ein Optimum. Der Temperaturwert sagt auch nichts darüber aus, wann die Umwandlung vollständig abgeschlossen ist. Wie schon erwähnt, gibt es metastabile Modifikationen, die lange beständig sind, obwohl sie aus thermodynamischer Sicht instabil sind.

Durch die relativ hohe Aufheizgeschwindigkeit bei der DTA (5K/-min) kann die Umwandlung in der kurzen Zeit nicht vollzogen werden, so daß sogar das Schmelzen der Modifikation II registriert wird. Aus der Schmelze bilden sich dann, wie unter 4.6., S. 101, erwähnt wurde, die Modifikation I. Die DTA-Untersuchungen mit niedrigeren Aufheizraten als 5 K/min (vgl. 5.6.2., S. 126) zeigten ja, daß verstärkt die Modifikation I nachgewiesen werden kann. Dieses Resultat unterstreicht die Bedeutung der für die Umwandlung erforderlichen Zeit.

Der exotherme Peak zwischen den zwei endothermen Schmelzpeaks zeigt also lediglich die Umwandlung bei der gewählten Aufheizgeschwindigkeit an, gibt aber nicht die tatsächlichen Verhältnisse wieder.

Die oben ermittelten Sättigungslöslichkeiten sind Grundlage für weitere Berechnungen den Umwandlungspunkt betreffend. Sie sollen im nächsten Abschnitt dargestellt werden.

5.6.6. Bestimmung der Umwandlungsenthalpie

Die Umwandlungsenthalpie läßt sich nach der folgenden Gleichung berechnen, die aus der unter 5.3.1., S. 111, angeführten Gleichung durch Umformung entstanden ist:

$$\Delta H_{I,II} = \frac{2{,}303 \cdot R}{\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2}} \cdot \log \frac{C_{s_{II(2)}} \cdot C_{s_{I(1)}}}{C_{s_{I(2)}} \cdot C_{s_{II(1)}}} \qquad \text{(Gl. 10)}$$

$\Delta H_{I,II}$	Umwandlungsenthalpie
R	allgemeine Gaskonstante
T_1	Temperaturwert 1
T_2	Temperaturwert 2
$C_{s_{II(1)}}$ bzw. (2)	Sättigungslöslichkeit der Modifikation II
$C_{s_{I(1)}}$ bzw. (2)	bzw. I bei Temperaturwert 1 oder 2

Der ermittelte Wert für $\Delta H_{I,II}$ beträgt 6,3 kJ/Mol.

Dieser Wert läßt sich in die folgenden Oberlegungen einbringen. Bei einer gegebenen Temperatur ist die Phase am stabilsten, die die geringste freie Enthalpie (freie Energie) G aufweist. Bei dem angesprochenen Prozeß handelt es sich um eine isobare Umwandlung von Festkörpern, so daß Druck und Volumen außer Acht gelassen werden können.

Für zwei polymorphe Modifikationen gilt bei einer gegebenen Temperatur (143):

$$\Delta G_{I,II} = \Delta H_{I,II} - T \cdot \Delta S_{I,II} \qquad \text{(Gl. 11)}$$

G = freie Energie
H = Lösungsenthalpie
S = Entropie
T = Temperatur

Da im thermodynamischen Gleichgewicht - im vorliegenden Fall bei 317 K (44 °C) - die freie Energie 0 wird, gilt:

$$\Delta H_{I,II} = T \cdot \Delta S_{I,II} \qquad \text{(Gl. 12)}$$

Die Entropiedifferenz $\Delta S_{I,II}$ errechnet sich folglich zu 19,9 J Mol^{-1} K^{-1}.

Im folgenden Abschnitt soll ein Oberblick über die in diesem Kapitel ermittelten Ergebnisse gegeben werden.

5.7. Zusammenfassung der Ergebnisse und Schlußbetrachtung

Im folgenden Schema sind die über die Polymorphie des Digoxigenins ermittelten Ergebnisse zusammengefaßt. Neben der Enantiotropie der Modifikationen I und II werden auch die Erscheinungen, die das amorphe Digoxigenin betreffen, berücksichtigt.

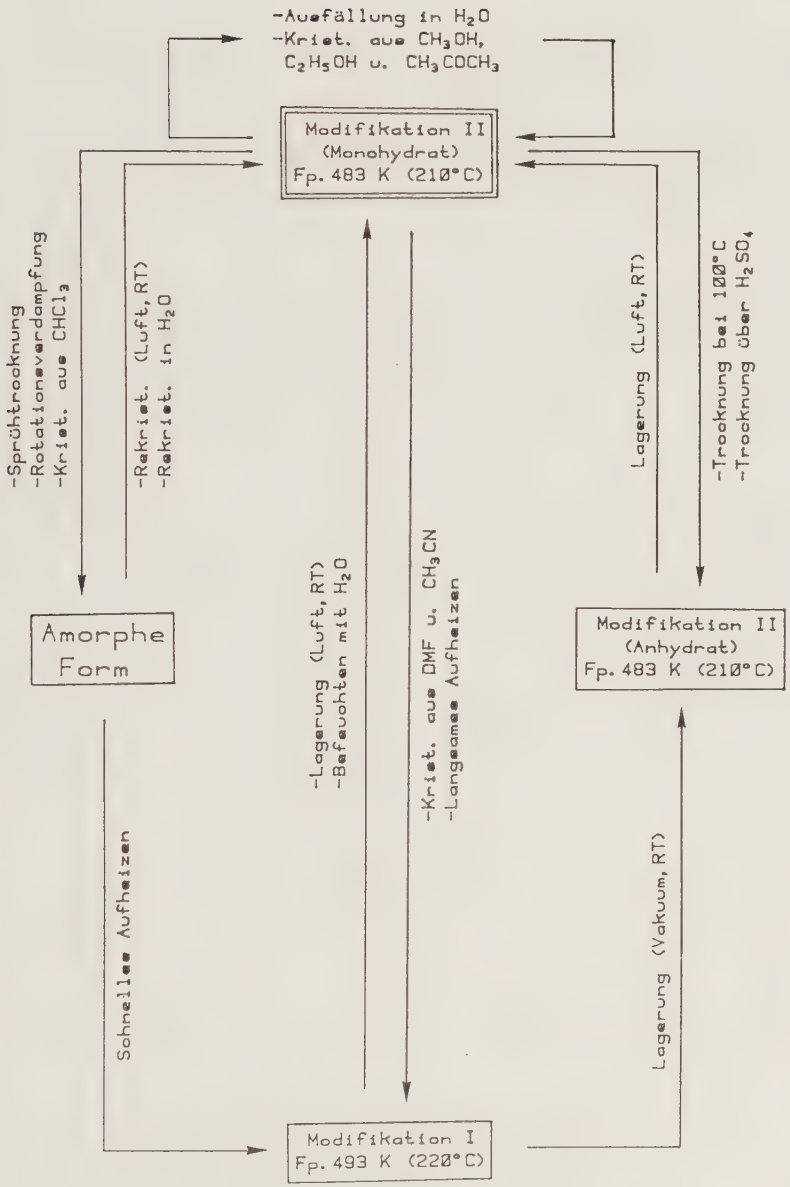


Abb. 63 Gewinnung und Veränderung der Zustandsformen des Digoxigenins

Aus der Abbildung geht hervor, daß Modifikation II (Fp. 483 K = 210 °C) in Form des Monohydrats die bei Raumtemperatur stabile Kristallform darstellt. Als solches resultiert sie bei der Ausfällung organischer Lösungen in Wasser bzw. kristallisiert es aus den gebräuchlichen Lösungsmitteln wie Methanol, Ethanol oder Aceton.

Nach der Trocknung bei 373 K (100 °C) oder über Schwefelsäure im Vakuum fällt Modifikation II als Anhydrat an, das sich an der Luft bei RT schnell wieder ins Monohydrat zurückverwandelt. Durch langsames Aufheizen der Modifikation II bei der DTA bildet sich thermotrop eine höher schmelzende wasserfreie Modifikation I (Fp. 493 K = 220 °C). In dieser Form kristallisiert Digoxigenin auch aus Lösungen mit DMF oder Acetonitril aus. Die Modifikation I geht bei Lagerung an der Luft innerhalb von 2 Monaten wieder vollständig in Modifikation II über. Bei direktem Wasserkontakt läuft die Rückumwandlung in 36 Stunden ab. Durch eine 3 Monate dauernde Lagerung im Vakuum bei RT läßt sich das Anhydrat der Modifikation II gewinnen.

Durch Amorphisierungsverfahren wie Sprühtrocknung oder Rotationsverdampfung läßt sich aus Modifikation II ein vollamorphes Produkt herstellen. Zum gleichen Ergebnis führt die Kristallisation aus Chloroform. Durch intensives Mahlen entstehen teilamorphe Produkte. Amorphes Digoxigenin geht wie Modifikation I bei Lagerung an der Luft bei RT innerhalb von ca. 4 Jahren in das Monohydrat der Modifikation II über. Beschleunigt wird dieser Rekristallsierungsprozeß durch direkte Wassereinwirkung. Modifikation I kann aus dem amorphen Produkt thermotrop durch schnelles Aufheizen bei der DTA gebildet werden.

Die Darstellung der Modifikationen und ihrer Umwandlungsprozesse machen deutlich, daß beim Digoxigenin keine metastabile Kristallformen existieren. Die neu dargestellte Modifikation I ist nicht metastabil, sondern verwandelt sich bereits nach kurzer Zeit (s.o.) quantitativ in die bei RT thermodynamisch stabile Form II um, so daß nur dieser eine biologische Bedeutung beim Einsatz in Arzneiformen zukommt. Aus diesem Grunde wurde bei den folgenden Versuchen die Modifikation II in Form des Monohydrats eingesetzt.

6. Digoxigenin in Liposomen

Wie unter 1.1.3., S. 7 , ausgeführt wurde, soll im Rahmen dieser Arbeit nach Möglichkeiten gesucht werden, das Auflösungsverhalten des relativ schlecht wasserlöslichen Digoxigenins zu verbessern.

Es stellte sich die Frage, ob das Versprühen von Tensiden aus der Phospholipid-Reihe zusammen mit Kolloiden und Wirkstoff eine weitere Steigerung der Sättigungslöslichkeit und Stabilität gegenüber den bisher eingesetzten Sprüheinbettungen bewirken würde.

Da Phospholipide vor allem als Hauptbestandteil von Liposomen Verwendung finden, sollte auch ein besonderes Augenmerk auf diese Form hinsichtlich des Freisetzungsverhaltens von Digoxigenin gerichtet werden. Der Einschluß in Liposomen könnte für Digoxigenin auch einen Schutz vor metabolischem Abbau im Organismus bewirken. Beobachtungen dieser Art sind von verschiedenen Autoren bei Digoxin, das in Liposomen eingeschlossen war, gemacht worden (175-178). Diese Präparationen stellten stets flüssige Systeme dar.

Im Vordergrund der Oberlegungen zur Optimierung von festen Digoxigenin-Arzneiformen sollte nun die Frage stehen, ob sich digoxigeninhaltige Liposomen mittels Sprühtrocknung in ein festes Produkt überführen lassen. Ein pulverförmiges Produkt könnte nämlich die Grundlage für eine oral applizierbare feste Arzneiform sein (198,199).

Auf anderem Wege gewonnene feste, Liposomen enthaltende Präparationen sind in der Patentliteratur beschrieben: das Spektrum der eingesetzten Wirkstoffe reicht von Acetylsalicylsäure (173) über Benzodiazepine (172) bis hin zu inhalativen Allergenen (171). Die Oberführung in den festen Zustand erfolgt nach diesen Patenten durch Gefriertrocknung. Besonders relevant im Hinblick auf Digoxigenin schien das Patent zu sein, das durch Einschluß in Liposomen die Oberführung schlecht wasserlöslicher

und schwer resorbierbarer Wirkstoffe, wie z.B. des Strophantins, in eine vom Intestinaltrakt resorbierbare Form aufzeigt (174).

6.1. Grundlagen der Liposomenentstehung

Im Folgenden soll auf die Gewinnung von digoxigeninhaltigen Liposomen eingegangen werden, wobei zunächst die Eigenschaften der eingesetzten Hilfsstoffkomponenten referiert werden.

6.1.1. Phospholipide als Strukturträger

Unter Lecithin versteht man ein Gemisch aus polaren (Phospho- und Glycolipide) und unpolaren Lipiden (Neutrallipide). Je nach Herkunft - tierisch oder pflanzlich - variieren die verschiedenen Lipidanteile sowie weitere Begleitbestandteile. Die Phospholipide, präziser die Glycerophospholipide, die den Hauptbestandteil ausmachen, sind nach der IUPAC-Nomenklatur (145) Verbindungen, die Phosphorsäure als Mono- oder Diester enthalten und zumindest eine O-Acyl-, O-Alkyl- oder O-(1-Alkenyl)-Gruppe an den Glycerolrest gebunden aufweisen (146).

Durch eine Reihe von Reinigungs- und Aufbereitungsschritten gelingt es heute, industriell standardisierte Phospholipide für unterschiedliche Einsatzbereiche zu gewinnen (147). So liegt beispielsweise der Phosphatidylcholinanteil von pharmazeutisch eingesetzten Sojalecithinen bei 96 %, während er beim rohen Ausgangsmaterial nur 31,7 % beträgt (148). Durch Modifizieren der veresterten Fettsäurereste erhält man partialsynthetische Lecithine mit definierten Kettenlängen und Sättigungsgraden.

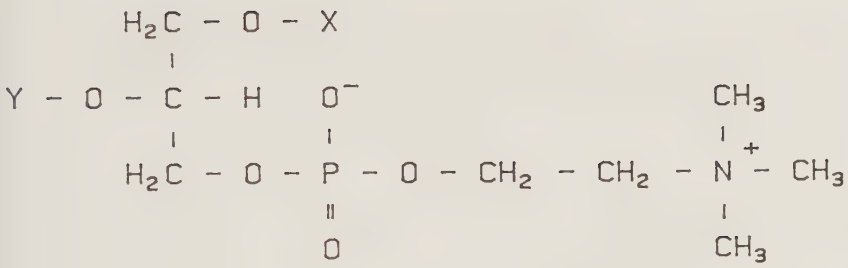


Abb. 64 Struktur von Phosphatidylcholin (Lecithin) nach (4)

X = Palmitinsäure, Stearinsäure, Ölsäure, Linolsäure } vorwiegend gesättigte Fettsäurereste

Y = Ölsäure, Linolsäure, Linolensäure } vorwiegend ungesättigte Fettsäurereste

Die bekanntlich wichtigste pharmazeutisch relevante Eigenschaft des Lecithins - wie überhaupt aller Phospholipide - stellt die Wechselwirkung mit Wasser dar. Durch den amphiphilen Molekülaufbau, der in der letzten Abbildung deutlich wird, ist es in der Lage, sowohl Emulsionen vom W/O-Typ, als auch solche vom O/W-Typ - je nach Art und Menge der verwendeten Lipidphase - zu stabilisieren (150).

Unter geeigneten Bedingungen ordnen sich die Phospholipidmoleküle in rein wäßriger Umgebung in Doppelschichten (bilayer) an und bilden uni- bzw. multilamellare Vesikel bzw. Liposomen aus (151). Hierbei werden verschiedene flüssig-kristalline Phasenübergangszustände durchlaufen. Gemäß den Nomenklaturbestimmungen der New York Academy of Sciences vom September 1977 werden die Liposomen folgendermaßen eingeteilt (152):

- multilamellare (multilamellar vesicles MLV) (bis 4 µm) (vgl. Abb. 65, S. 144)
- kleine unilamellare mit einem Durchmesser von 20 bis 30 nm (small unilamellar vesicles SUV) (vgl. Abb. 66, S. 144).

- große unilamellare mit einem Durchmesser von 4 bis 7 µm (large unilamellar vesicles LUV) und
- Phasenumkehrliposomen (reverse phase liposomes REV) (bis 10 µm)

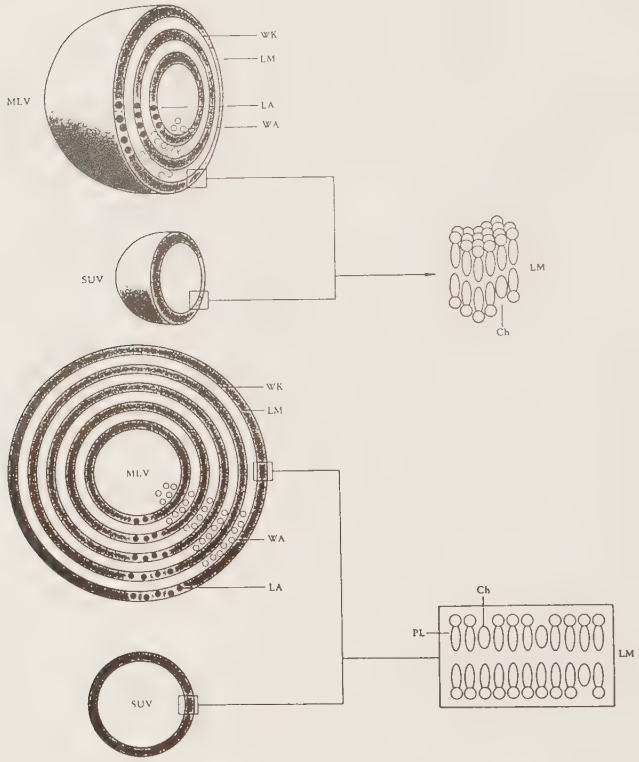


Abb. 65 Querschnitt durch ein multilamellares (MLV) und ein unilamellares (SUV) Liposom nach SCHREIER (153)

WA Wasserlösliche Arzneistoffe
WK Wäßriges Kompartiment
LA Lipidlösliche Arzneistoffe
LM Lipidmembran
CH Cholesterol
PL Phospholipid

In der Literatur sind eine ganze Reihe von Verfahren zur Herstellung der einzelnen Typen beschrieben, so daß hier auf Obersichtsartikel verwiesen werden kann (147,152). Kennzeichnend für alle Methoden ist der Einsatz hochwirksamer Dispergierungsapparaturen, die z.B. mit Ultraschall oder mit Hochdruckdüsen arbeiten.

Die spezifische Tensidanordnung befähigt Liposomen zur Aufnahme von hydrophilen, bzw. im Bereich der Fettsäureketten, von lipophilen Stoffen. Dadurch können Liposomen als Arzneistoffträger mit besonderen pharmakokinetischen Eigenschaften dienen, die aus pharmakologischer Sicht nicht dem klassischen LADME-System gehorchen (194-197).

6.1.2. Die Sojaphosphatide NC 95 und NC 95 H

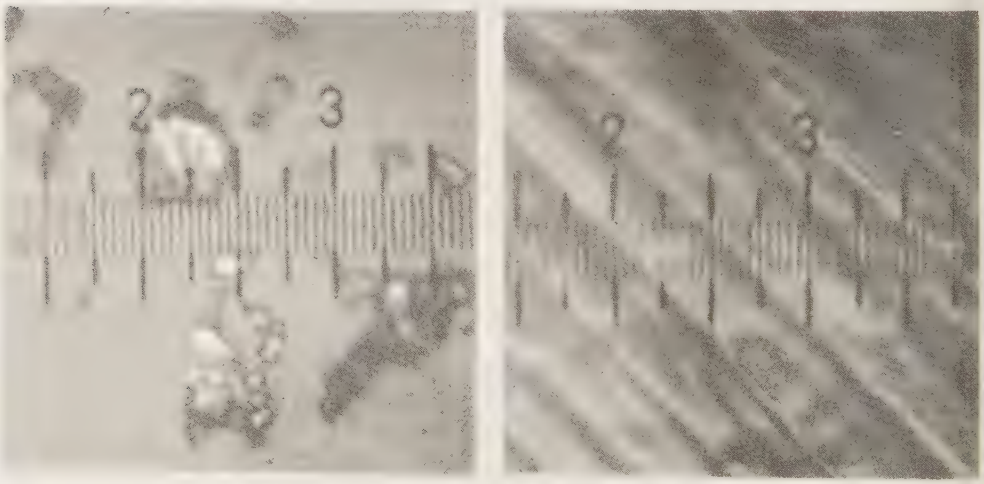
Für unsere Versuche standen zwei hochreine Produkte zur Verfügung: die Sojaphosphatide NC 95 und NC 95 H.

Bei NC 95 handelt es sich um ein entöltes Lecithin, das weder Kephalin noch Inositphosphatide enthält. NC 95 H wird durch Hydrierung der ungesättigten Fettsäurereste daraus hergestellt.

Beide Sojaphosphatide wurden für den pharmazeutischen Bereich konzipiert; sie dienen einerseits als Emulgatoren und Lösungsvermittler für Pharmaka in wäßrigem Medium und andererseits als Bausteine für Liposomen. Die folgende Tabelle weist die unterschiedlichen Eigenschaften der zwei Sojaphosphatide aus.

Tab. 27 Vergleich der Eigenschaften von NC 95 und NC 95 H nach (149)

	NC 95	NC 95 H
Zustandsform	plastisch verformbar	pulverförmig
Farbe	gelb bis braungelb	weiß
Löslichkeit	sehr leicht löslich in Ether, Petrolether, $CHCl_3$, Ethanol, Hexan	
Phosphatidylcholin-Gehalt	90 - 96 %	96,7 %
Lysophosphatidylcholin-Gehalt	< 6 %	0,3 %
H_2O-Gehalt	< 1,5 %	0,24 %
Säurezahl	< 0,5	0,36
Jodzahl	90 - 105	0
Peroxidzahl	< 5	0



A) NC 95 H ⟷ 100 µm B) NC 95 ⟷ 50 µm

Abb. 66 Polarisationsmikroskopische Aufnahmen der unbehandelten Sojaphosphatide

Im Polarisationsmikroskop stellt sich NC 95 überwiegend amorph dar. Das schwache Auftreten der Polarisationsfarben an den Substanzrändern läßt in untergeordnetem Maße auf die Anwesenheit kristalliner Bereiche schließen (vgl. Abb. 66B).

Das folgende Röntgendiffraktogramm bestätigt diesen Befund: aus einem "Bauch", der den Streuanteil der amorphen Anteile widerspiegelt, ragen einige diskrete Peaks heraus, die kristalline Bezirke repräsentieren (vgl. Abb. 67B).

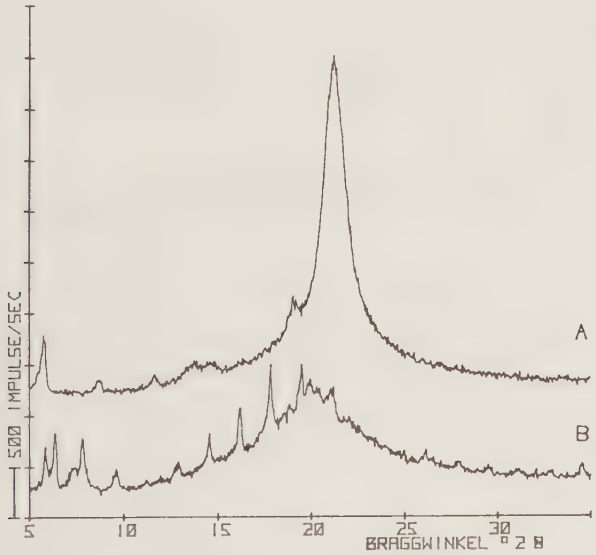


Abb. 67 Röntgendiffraktogramme von A) NC 95 H und B) NC 95

Im Gegensatz dazu zeigt sich NC 95 H im Polarisationsmikroskop kristallin, erkenntlich am deutlichen Auftreten von Polarisationsfarben (vgl. Abb. 66A). Das Röntgendiffraktogramm weist neben einigen kleineren einen sehr ausgeprägten Peak bei einem Bragg-Winkel von 21,25° 2Θ auf (vgl. Abb. 67A).

Auch die DTA-Kurven der beiden Substanzen weisen auf die unterschiedlichen Eigenschaften hin. In der folgenden Kurve des NC 95 erkennt man neben unspezifischen Auslenkungen lediglich den Schmelzpunkt bei 497,6 K (224,6 °C).

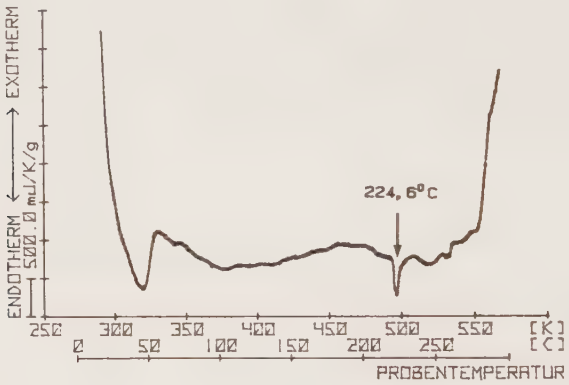


Abb. 68 DTA-Aufnahme von unbehandeltem Sojaphosphatid NC 95

NC 95 H hingegen durchläuft vor dem endgültigen Übergang in eine klare Schmelze bei 522,2 K (249,2 °C) eine Reihe von flüssigkristallinen Zuständen (vgl. 150), die durch kleine endotherme Peaks angezeigt werden (vgl. Abb. 69).

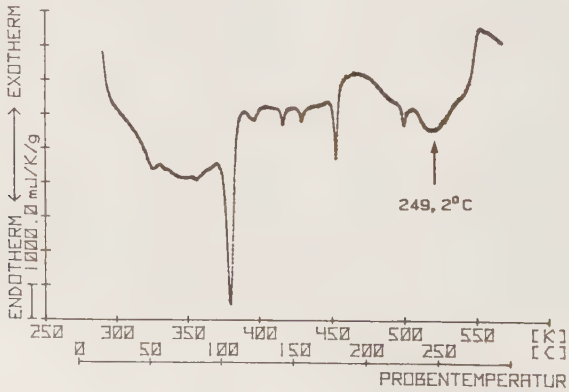


Abb. 69 DTA-Aufnahme von unbehandeltem Sojaphosphatid NC 95 H

Auf das unterschiedliche thermische Verhalten wird, soweit es für die Liposomenherstellung von Bedeutung ist, im nächsten Abschnitt näher eingegangen.

6.1.3. Bestimmung der Phasenübergangstemperatur

Auf einen für die Liposomenherstellung wesentlichen Parameter soll in diesem Kapitel näher eingegangen werden. Es handelt sich um die sogenannte Phasenübergangstemperatur der Phospholipide. Sie beschreibt die reversible Transformation der Fettsäureketten von einem geordneten kristallartigen Zustand in einen flüssigkeitsähnlichen (159).

Mit der DTA kann diese Phasenübergangstemperatur ermittelt werden, wenn bei der Vorbereitung der Proben sorgfältig vorgegangen wird (160). Beim Aufheizen reiner Substanzproben ist der Phasenübergang allerdings praktisch nicht zu erkennen (vgl. Abb. 68 und 69); er läuft dann auch nicht reversibel ab. In wäßrigem Medium hingegen kann er in reproduzierbarer Weise dargestellt werden, wie die Abb. 70 und 71 zeigen.

Gemäß Tabelle 28 wurden also Substanzproben in Al-Tiegel eingewogen und jeweils die gleiche Menge Wasser hinzupipettiert. Anschließend wurden die Tiegel mit einem Deckel fest verschlossen.

Tabelle 28 Zusammensetzung der Proben

Einwaage	Probe 1	Probe 2
NC 95	2,07 mg	-
NC 95 H	-	2,15 mg
Aqua dest.	60,0 mg	60,0 mg

Vor der ersten Analyse wurden die Tiegel drei Stunden oberhalb der erwarteten Phasenübergangstemperatur gelagert. Das beinhaltete für die NC 95-haltigen Proben eine Lagerung bei Raumtemperatur (293 K, 20 °C) und für die NC 95 H-haltigen eine Lagerung bei einer Temperatur von 333 K (60 °C) im Trockenschrank. Dieser Schritt sollte dem Wasser das Eindringen in das hydrophobe Lecithin erleichtern. Bei der eigentlichen Messung in der DTA-Apparatur diente Wasser als Referenz. Die Proben wurden mit einer Scan-Rate von 2,5 K/min aufgeheizt, mit gleicher Geschwindigkeit wieder abgekühlt, und sofort anschließend nochmals aufgeheizt. Der untersuchte Temperaturbereich lag zwischen 293 K (20 °C) und 323 K (70 °C). Abbildung 70 zeigt zunächst die bei der Untersuchung von NC 95 H erhaltenen Ergebnisse.

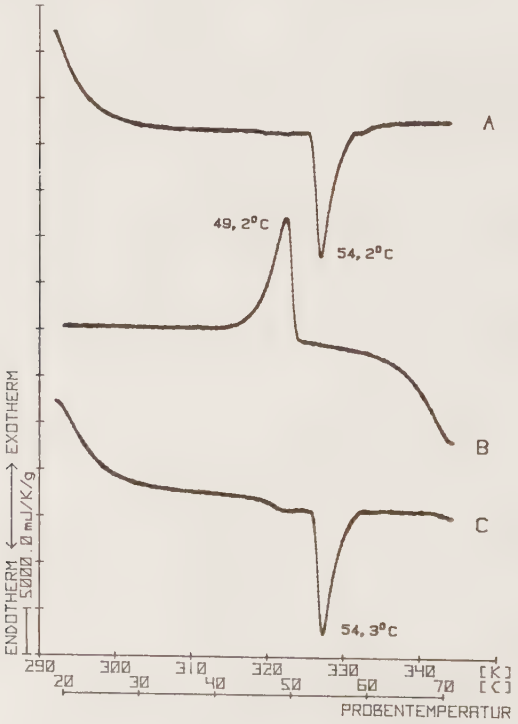


Abb. 70 DTA-Aufnahmen von NC 95 H in Wasser
A) 1. Aufheizkurve B) Abkühlkurve C) 2. Aufheizkurve

Beide A u f h e i z k u r v e n weisen einen sehr kleinen, kaum wahrnehmbaren endothermen Peak ("Vorpeak") bei rund 325 K (52 °C) auf und einen sehr ausgeprägten, ebenfalls endothermen ("Hauptpeak") bei 328 K (55 °C). Dieser letzte Peak ist bei der A b k ü h l k u r v e größenmäßig unverändert, aber infolge Unterkühlung der Probe nach tieferen Temperaturen hin verschoben. Die bei den Aufheizkurven beobachtete kleine Auslenkung ist hierbei nicht festzustellen.

In Tabelle 29 werden die ermittelten Werte dargestellt:

Tabelle 29 Ergebnisse der DTA-Untersuchungen von NC 95 H

NC 95 H	Vorpeak	Hauptpeak
1. Aufheizkurve	325,7 K (52,7 °C)	327,2 K (54,2 °C)
Kühlkurve	-	322,2 K (49,2 °C)
2. Aufheizkurve	325,0 K (52,0 °C)	327,3 K (54,3 °C)

Beim Sojaphosphatid NC 95 wurde - wie schon erwähnt - davon ausgegangen, daß der Phasenübergang unter 273 K (0 °C) stattfinden würde. Deshalb wurde der Temperaturbereich zwischen 228 K (-45 °C) und 278 K (5 °C) untersucht. Es mußte jedoch damit gerechnet werden, daß die Transition nicht feststellbar sein würde, da Wasser bei diesen niedrigen Temperaturen gefriert.

Die folgende Abbildung 71 macht jedoch deutlich, daß die Bestimmung in reinem Wasser möglich war. Die beiden Aufheizkurven weisen einen reproduzierbaren endothermen Peak bei 272 K (-1 °C) auf und zeigen den gleichen Verlauf, der bei NC 95 H festgestellt werden konnte. Die erste Aufheizkurve zeigt auch einen Vorpeak bei etwa 265 K (-8 °C).

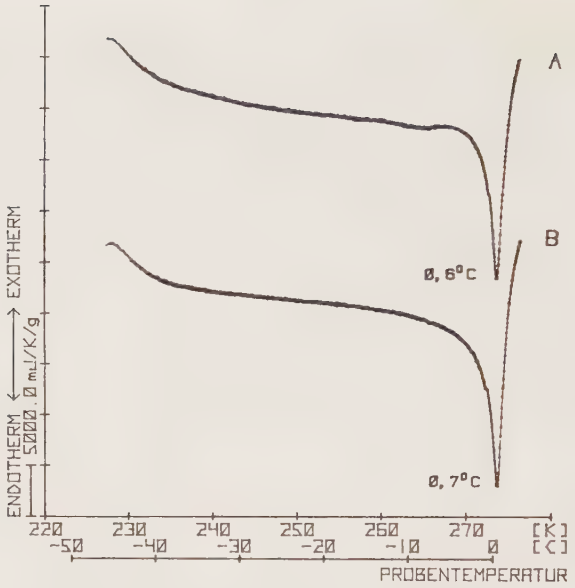


Abb. 71 DTA-Aufnahmen von NC 95 in Wasser
A) 1. Aufheizkurve B) 2. Aufheizkurve

Eine Abkühlkurve konnte allerdings nicht aufgenommen werden, da das Wasser unter den gewählten Bedingungen im angesprochenen Temperaturbereich erstarrte, was sich im Thermogramm in einem sehr großen, exothermen Peak äußerte. Salzlösungen oder Diethylenglykol-Wasser-Mischungen, die einen niedrigeren Gefrierpunkt als Wasser aufweisen, wurden aber trotzdem nicht eingesetzt, da Wechselwirkungen nicht auszuschließen waren.

Die folgende Tabelle 30 gibt die ermittelten Werte an:

Tabelle 30 Ergebnisse der DTA-Untersuchungen von NC 95

NC 95	Vorpeak	Hauptpeak
1. Aufheizkurve	265,2 K (-7,8 °C)	273,6 K (0,6 °C)
2. Aufheizkurve	-	273,7 K (0,7 °C)

Diese für NC 95 erhaltenen Werte decken sich jedoch nicht mit der vom Hersteller angegebenen Phasenübergangstemperatur (155). Es wird ein Wert von 247,9 K (-25,1 °C) genannt, der durch die DSC-Messung einer 20proz. wäßrigen Dispersion ermittelt worden war. Eine Temperatur in dieser Höhe ist aber als unwahrscheinlich anzusehen, da reines Wasser bei 248 K (-25 °C) in jedem Fall gefroren ist und somit nicht mehr mit Lecithin in der Weise reagieren kann, die einen Phasenübergang ermöglicht.

Der für NH 95 H hingegen angegebene Wert ist mit der selbst ermittelten Phasenübergangstemperatur identisch.

6.1.4. Bedeutung der Phasenübergangstemperatur

Aus den DTA-Kurven des vorherigen Absatzes (6.1.2., S. 145) kann entnommen werden, daß der Phasenübergang der Phospholipide in Wasser signifikant ausfällt und reversibel ist. Es wurde ebenfalls deutlich, daß sich eine Phasenumwandlung beim Aufheizen in zwei endothermen Auslenkungen äußert, nämlich einem kleinen Vorpeak (pretransition peak) und einem großen Hauptpeak (transition peak) (163).

Nach JANIAK et al. (162) bilden die Phospholipide unterhalb der Phasenübergangstemperatur ein eindimensionales kristallines Gitter aus (gel like state), wobei die Fettsäureketten getiltet (schräg gestellt) sind. Mit Erreichen der Prätransitionstemperatur entsteht ein zweidimensionales Gitter, das wellenförmig verzerrt ist. Bei der eigentlichen Phasenübergangstemperatur schmelzen die Fettsäureketten der Phospholipide und erlangen flüssigkeitsähnliche Freiheitsgrade (fluid like state) (164). Aus diesem Vorgang resultiert schließlich wieder ein eindimensionales, lamellar aufgebautes Gitter (161).

In diesem "flüssigen Zustand" werden die Fettsäureketten kürzer, beweglicher und beanspruchen mehr Raum. Dadurch erhöht sich auch die Beweglichkeit der hydrophilen Kopfgruppe. Das er-

möglicht die Quellung der Phospholipide, weil jetzt verstärkt Wasser in die lamellare Schichtstruktur eindringen kann. Es entstehen sogenannte smektische Mesophasen, die aufgrund ihrer Entstehungsart auch lyotrop genannt werden (150).

Da die Phasenübergangstemperatur also die Temperatur angibt, bei der schlagartig größere Mengen Wasser in das Kristallgitter der Phospholipide eindringen können, entspricht sie dem Krafft-Punkt; er bezeichnet diejenige Temperatur, bei der die Sättigungslöslichkeit grenzflächenaktiver Substanzen die kritische Mizellbildungskonzentration erreicht (154,191,192,193).

Der Betrag der Phasenübergangstemperatur hängt neben der Kettenlänge entscheidend von der Anzahl der Doppelbindungen ab: mit zunehmendem Sättigungsgrad steigt sie an. So liegen die Werte der eingesetzten Sojaphosphatide NC 95 und NC 95 H, wie unter 6.1.3., S. 149, beschrieben, bei 273,6 K (0,6 °C) und 327,2 K (54,2 °C).

Dieser Unterschied hat einen wesentlichen Einfluß auf die Lagerungsfähigkeit der daraus hergestellten Liposomen. Aus dem oben Gesagten folgt, daß NC 95 bei Raumtemperatur (293 K, 20 °C) flüssig-kristallin vorliegt, NC 95 H jedoch noch kristallin und damit stabiler. Durch die starre Anordnung der Fettsäureketten im hydrierten Produkt kann der Stofftransport durch die Lipidmembran erschwert werden (156).

6.1.5. Einfluß von Cholesterol

Eine weitere Möglichkeit zur Stabilisierung der Lipidmembran besteht im Einbau von Cholesterol. Über diese Maßnahme wird von verschiedenen Autoren berichtet; sie konnten eine beachtliche Verminderung des Verlustes an eingeschlossenem Material beim Vergleich von Liposomen mit und ohne Cholesterolzusatz bei identischen Lagerbedingungen beobachten (156,157).

Beim Einsatz diverser Analysentechniken wie z.B. der Raman-Spektroskopie, der NMR-Spektroskopie oder der Neutronendiffraktometrie wurde deutlich, daß in Lipidmembranen eingebautes Cholesterol die Anordnung der Fettsäureketten von Phospholipiden stört (166). Nach LADBROOKE (163) resultiert ein Zustand, der zwischen der unter 6.1.4., S. 153, beschriebenen "kristallinen Gelstruktur" und der flüssig-kristallinen Struktur, die bei Überschreiten der Phasenübergangstemperatur erreicht wird, einzuordnen ist. Dieser Zustand ist allerdings nur in Gegenwart von Wasser zu beobachten. Beim Entfernen des Wassers durch Eindampfen kristallisieren Phospholipid und Cholesterol unabhängig voneinander aus.

Durch thermoanalytische Untersuchungen von Phospholipid (gesättigt und ungesättigt) -Cholesterol-Mischungen in Wasser kann man feststellen, daß mit steigendem Cholesterolgehalt der Vorumwandlungspeak des Phospholipids vollständig verschwindet und sich der Transitionspeak zunehmend verbreitert. Bei einem molaren Verhältnis von 1 : 1 verschwindet er vollständig. Ein noch höherer Cholesterolgehalt ist nicht sinnvoll, da Cholesterol dann auskristallisiert (152).

Röntgenuntersuchungen belegen, daß das zwischen die beiden Schichten des Bilayers einer Lipidmembran eingeschlossene Wasser mit zunehmendem Cholesterolanteil im Bilayer verstärkt strukturierte Bereiche ausbildet. Das bedeutet, daß die Wassermoleküle Assoziate einer bestimmten Struktur formen, die man als "eisartige Molekel" bezeichnet (167). Dieser durch die hydrophoben Wechselwirkungen der Lipidanteile induzierte Effekt ist für die relativ gesteigerte Stabilität von Phospholipid-Cholesterol-Membranen verantwortlich (165).

Die Abbildungen 72 und 73 veranschaulichen den Einfluß von Cholesterol auf die Sojaphosphatide NC 95 und NC 95 H.

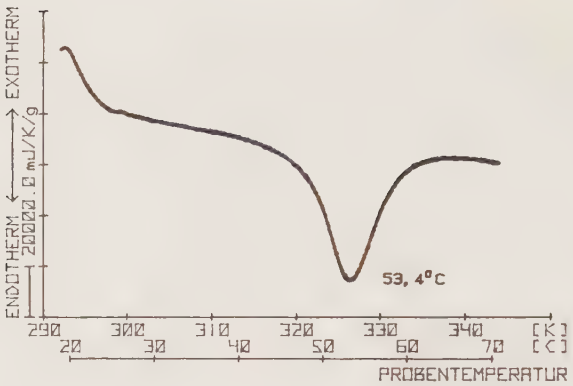


Abb. 72 DTA-Aufnahme einer NC 95 H-Cholesterol-Mischung (3,5 : 1) in Wasser

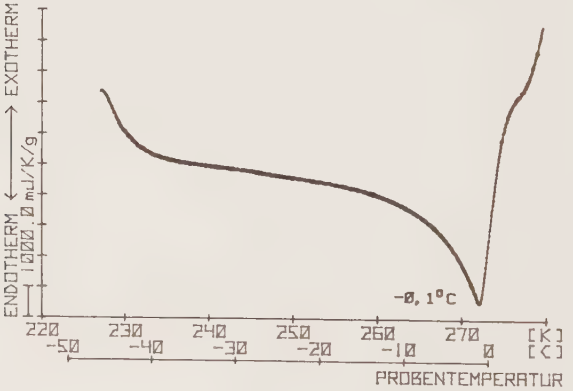


Abb. 73 DTA-Aufnahme einer NC 95-Cholesterol-Mischung (3,5 : 1) in Wasser

Das molare Verhältnis der beiden Komponenten betrug bei diesen Versuchen 3,5 : 1 (Sojaphosphatid/Cholesterol); es entspricht der bei der späteren Liposomenherstellung gewählten Relation (vgl. 6.1.6., S. 157). Der Umwandlungspeak ist sowohl bei NC 95 als auch bei NC 95 H deutlich unschärfer geworden (vgl. Abb. 70, S. 150, und 71, S. 152) und die Vorumwandlung nicht mehr zu

erkennen. Das Maximum hat sich in beiden Fällen zu etwas niedrigeren Werten hin verlagert. So beträgt die Phasenumwandlungstemperatur bei der NC 95-Mischung jetzt 272,9 K (-0,1 °C) gegenüber 273,6 K (0,6 °C) bei der Reinsubstanz und bei der NC 95 H-Mischung 326,4 K (53,4 °C) gegenüber 327,2 K (54,2 °C).

6.1.6. Herstellung von digoxigeninhaltigen Liposomen

Für die Untersuchung der Eigenschaften von Liposomen sollten MLV mit vereinheitlichtem Größenspektrum eingesetzt werden, da deren Herstellung nur einen relativ geringen materiellen und zeitlichen Aufwand erfordert. Ausgangsprodukt sind zunächst klassische MLV, so daß auf deren Herstellung zuerst eingegangen werden soll.

Alle Bestandteile, also Lecithin, Cholesterol und Digoxigenin, wurden in dem in der Tabelle 31 angegebenen Mengenverhältnis in einen 1000 ml-Rundkolben eingewogen und in 180 ml eines Chloroform/Methanol-Gemisches (2 : 1) gelöst (158).

Tabelle 31 Zusammensetzung der digoxigeninhaltigen Liposomen

	Einwaage (mg)	Einwaage (mmol)
Digoxigenin	50,0	0,13
Cholesterol	39,0	0,10
NC 95 bzw. NC 95 H	267,0	ca. 0,35

Das Lösungsmittel wurde anschließend in einem Rotationsverdampfer bei 333 K (60 °C) Wasserbadtemperatur wieder entfernt, so daß auf der Wandung des Kolbens ein dünner, trockener Film zurückblieb.

Der entstandene Film wurde dann in 25 ml einer 8 millimolaren

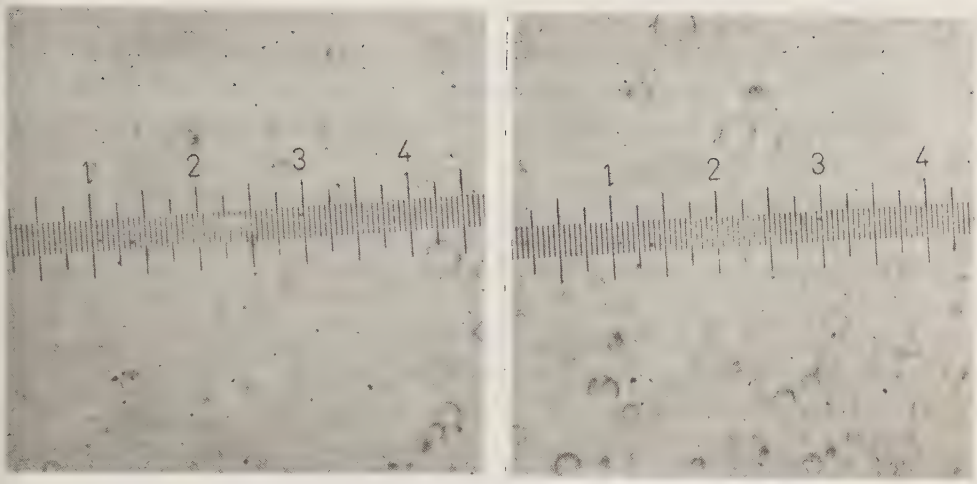
Calciumchloridlösung auf einer Schüttelmaschine bei wiederum 333 K (60 °C) dispergiert. Bei diesem Schritt entstehen die MLV durch die Hydratisierung der eingesetzten Phospholipide. Die Hydratisierung gelingt dann vollständig, wenn das Schütteln langsam und gleichmäßig erfolgt (147). Dieser Vorgang war i.a. nach 3 Stunden abgeschlossen. Eine Inertbegasung zur Verhinderung der Autoxidation ungesättigter Lipide war nicht erforderlich, da einerseits NC 95 ca. 0,25 % α-Tocopherol als Stabilisator enthält (149) und NC 95 H andererseits aufgrund der Hydrierung ohnedies keine ungesättigten Anteile aufweist.

Es entstand eine milchige Dispersion, die im Falle von NC 95 H weiß, im Falle von NC 95 leicht gelblich gefärbt war.

Die mikroskopisch erkennbare Größenverteilung der so gewonnenen Liposomen bewegte sich zwischen 0,8 µm und 5,9 µm, so daß von einer einheitlichen Teilchengröße nicht gesprochen werden kann.

Nicht eingeschlossenes Digoxigenin wurde durch zweimaliges Abzentrifugieren in einer Laborzentrifuge bei 1800 Umdrehungen pro Minute, d.h. 6000 g, und anschließendes Redispergieren in frischer Calciumchloridlösung abgetrennt.

Eine Verkleinerung der Liposomen und - damit verbunden - eine Homogenisierung des Größenspektrums wurde durch eine 10-minütige Behandlung mit Ultraschall erreicht. Die in eine Rosette-Zelle geeigneter Größe gefüllte Liposomendispersion wurde mit Eiswasser gekühlt - dies kann bei NC 95 H wegen der hohen Phasenübergangstemperatur entfallen - und die Beschallung pulsierend durchgeführt, um ein Aufheizen und eine möglicherweise daraus resultierende Peroxidbildung zu vermeiden (152). Man erhält eine opaleszente Dispersion, die nochmals bei relativ niedriger Umdrehungsgeschwindigkeit (5000 g) zentrifugiert wurde, um den Metallabrieb des Ultraschall-Gebers abzutrennen. Die Größe der so erhaltenen Liposomen bewegte sich jetzt im Bereich von 2,5 µm (vgl. Abbildung 74).



A) NC 95 H 5 µm B) NC 95 5 µm

Abb. 74 Mikroskopische Aufnahmen von Liposomen nach Ultraschall-Beschallung

Chemische Veränderungen des Digoxigenins durch diese Ultraschallbehandlung konnten mittels HPLC nicht nachgewiesen werden.

6.1.7. Bestimmung des Digoxigeningehaltes

Der Digoxigeningehalt der erhaltenen Liposomen wurde mittels HPLC über eine vorher erstellte Eichgerade bestimmt. Diese Methode war deswegen besonders geeignet, weil für die Durchführung der Analyse eine vorherige Abtrennung der Lipidanteile nicht notwendig war.

Eine definierte Menge frisch hergestellter Liposomendispersion mit bekanntem Feststoffanteil wurde zentrifugiert und der erhaltene Rückstand, bestehend aus Phospholipid, Cholesterol und Digoxigenin, durch mehrmaliges Ausschütteln mit Methanol extrahiert. Nachdem das gleiche Volumen Wasser zugesetzt worden war, konnte die Lösung direkt auf die HPLC-Säule gegeben werden.

Zur Kontrolle wurde auch der Digoxigeningehalt des nach der Zentrifugation erhaltenen klaren Oberstands ermittelt. Zur Bereitung der Analysenlösung mußte hier das gleiche Volumen Methanol zugesetzt werden.

Um einen maximalen Gehalt in den Liposomen zu erzielen, wurde der Ausgangslösung ein Überschuß an Digoxigenin zugesetzt. Diese Lösung wurde, wie schon beschrieben (vgl. 6.1.6., S. 157), in einem Rotationsverdampfer zur Trockene eingedampft. Nach der Hydratisierung des erhaltenen Lipidfilms war zu beobachten, daß aufgrund der relativ geringen Wasserlöslichkeit (vgl. 5.3.2., S. 112) noch ungelöstes Digoxigenin auf der Wandung des Rotierkolbens zurückblieb. Dieses wurde ebenfalls in einem Methanol-Wasser-Gemisch 1 : 1 aufgenommen und wie oben analysiert.

Aus den folgenden Tabellen 32 und 33 kann ersehen werden, daß unter den gewählten Versuchsbedingungen der größte Teil des für die Einschließung angebotenen Digoxigenins in die Liposomen eingeschlossen wurde.

Tabelle 32 Verbleib des Digoxigenins bei der Liposomenherstellung

	Liposomen	Oberstand	Kolbenwand
NC 95	79,1 %	13,0 %	7,9 %
NC 95 H	69,6 %	13,8 %	15,6 %

(Die Prozentangaben beziehen sich auf das eingesetzte Digoxigenin)

Tabelle 33 Einschlußvermögen der Liposomen bezogen auf Digoxigenin

	Verhältnis Digoxigenin/Lipidanteil in den Liposomen	
	mg/mg	mmol/mg
NC 95	0,129	$3{,}31 \times 10^{-4}$
NC 95 H	0,114	$2{,}91 \times 10^{-4}$

Im Falle der NC 95-Liposomen waren das 79,1 % und im Falle der NC 95 H-Liposomen 69,6 %. Im Überstand wurden im ersten Fall 13,0 %, im zweiten 13,8 % gefunden. Auf der Kolbenwand schließlich verblieben 7,9 % und 15,6 %.

Da die Angabe der jeweiligen Mengen in Prozent von der Ausgangsmenge allein irreführend ist, wurde zusätzlich auch das Verhältnis Masse bzw. Mol Digoxigenin zu Masse liposomalem Lipid angegeben (152).

Es fällt auf, daß die NC 95-Liposomen etwa 13 % mehr Digoxigenin aufnehmen als die mit NC 95 H hergestellten, so daß das Verhältnis Digoxigenin/Lipidanteil - jeweils in mg angegeben - bei ersterem 0,129, bei zweiterem 0,114 beträgt.

6.2. Gewinnung von Liposomensprüheinbettungen

Bei der Lagerung von Liposomendispersionen ergeben sich im allgemeinen Stabilitätsprobleme, die auf verschiedenen chemischen und physikalisch-chemischen Prozessen beruhen. Bevor auf ein neues Stabilisierungsverfahren eingegangen wird, soll zunächst der die Stabilität am meisten beeinflussende Faktor besprochen werden.

6.2.1. Problematik der Stabilität von Liposomen

Eine Gehaltsabnahme der inkorporierten Substanzen und eine Änderung der Freigabegeschwindigkeit während der Lagerung dienen als Indikator für die Stabilität von Liposomendispersionen, da die Durchlässigkeit der Liposomenmembranen - neben irreversiblen Sedimentationsvorgängen - die Haltbarkeit am meisten einschränkt (168).

Die komplexe Zusammensetzung der Liposomendispersionen beinhaltet eine Reihe von Faktoren, die im Hinblick auf die Stabilität variiert werden können.

Auf die Bedeutung des Phospholipid-Sättigungsgrades und den damit verknüpften Einfluß der Phasenübergangstemperatur wurde unter 6.1.4., S. 153, ja schon hingewiesen. Auch die membranstabilisierende Wirkung von Cholesterol wurde schon erwähnt (vgl. 6.1.5., S. 154).

Elektrolyte und Nichtelektrolyte, die im Dispersionsmittel Wasser gelöst werden, können über die resultierende Tonizität einen mehr oder weniger ausgeprägten Einfluß auf die Stabilität der Liposomen nehmen (156).

Die Eigenschaften der eingeschlossenen Substanz und die daraus resultierenden Wechselwirkungen mit dem Lipidanteil scheinen auch eine große Rolle zu spielen. Über dieses Phänomen ist allerdings noch nicht viel bekannt (157).

Die Optimierung aller Komponenten führte aber immer nur zu einer Einschränkung der Membrandurchlässigkeit, was zur Folge hat, daß das Konzentrationsgefälle zwischen Liposomeninhalt und umgebendem Medium mit zunehmender Lagerdauer ausgeglichen wird, indem ursprünglich inkorporierte Substanzen von innen nach außen diffundieren.

Der hierbei herrschende Einfluß des Dispersionsmittels Wasser läßt sich in flüssigen Präparaten naturgemäß nicht unterbinden. Weitergehende Stabilisierungsversuche liefen deshalb darauf hinaus die Wassermoleküle in ihrer Beweglichkeit einzuschränken. In einem europäischen Patent wird deshalb als Dispersionsmedium eine Gelmatrix aus in Wasser gelösten Polysacchariden bzw. Polypeptiden verwendet, die unterhalb Raumtemperatur fest, bei RT jedoch flüssig ist (169).

Diese Methode weist entscheidende Vorteile gegenüber dem einfachen Einfrieren in schmelzendem Stickstoff auf. Zwar werden so auch die Wassermoleküle fixiert, aber das Auftauen führt praktisch immer zu erheblichen Verlusten an eingeschlossenem Material, so daß nach weiteren Verfahren gesucht wurde (157).

Das Mittel der Wahl schien in der Gefriertrocknung zu bestehen, da mit diesem Verfahren auch andere empfindliche Systeme, wie biologisches Material erfolgreich in den trockenen Zustand unter Beibehaltung morphologischer Strukturen überführt werden konnte . Aber auch diese Methode führte zu keiner grundlegenden Verbesserung. Lediglich der Einsatz gesättigter Phospholipide, wie Distearoylphosphatidylcholin und Dipalmitoylphosphatidylglycerol, sowie der Zusatz von Laktose zum Dispersionsmedium schränkten die Zerstörung der Membranen bei der Rehydratation der Liposomen ein (157). Dieses Ergebnis gibt Anlaß Patentanmeldungen, die die Gefriertrocknung als geeignete Stabilisierungsmethode beinhalten, mit kritischen Augen zu betrachten (170-172).

Ein weiteres schonendes Trocknungsverfahren besteht bekanntlich in der Sprühtrocknung. Diese Methode als Stabilisierungsmöglichkeit für Liposomen ist in einem Patent angeführt, allerdings ohne daß irgendwelche näheren Angaben hinsichtlich der eventuell geeigneten Grundlagen (Kolloide oder niedermolekulare Stoffe) gemacht werden. Es liegt also nahe, daß es sich nur um einen formalen Anspruch handelt (170).

Aus diesem Grunde schien es reizvoll zu sein eigene Versuche in dieser Richtung durchzuführen, die im Folgenden dargestellt werden.

6.2.2. Sprühtrocknung als Methode zur Stabilitätserhöhung

Oblicherweise wurde früher die Sprühtrocknung von in Wasser schwer löslichen Verbindungen aus organischen Lösungsmitteln vorgenommen. Im vorliegenden Fall sollte aber ein wäßriges System unter besonders schonenden Bedingungen getrocknet werden, weil die Struktur der Liposomen nicht zerstört werden durfte. Es war somit klar, daß der Auswahl der geeigneten Sprühparameter eine entscheidende Bedeutung zukommen würde. DÖLLE (21)

hatte beim Einsatz eines Labor-Sprühtrockners für wäßrige Systeme noch Eingangstemperaturen in Höhe von 433 K (160 °C) gewählt, ausgehend von der Überlegung, daß Wasser erst bei Temperaturen oberhalb des Siedepunktes (373 K, 100 °C) ausreichend schnell verdampft werden kann.

Diese Werte waren aber für unsere Aufgabenstellung zu hoch, selbst wenn man davon ausgeht, daß die Trockendauer in einem Sprühtrockner - und damit die Temperaturbelastung - nur Sekundenbruchteile beträgt (49).

Es muß nämlich berücksichtigt werden, daß wegen der niedrigen Übergangstemperaturen (vgl. 6.1.3., S. 149) die Fettsäureketten schon so stark beweglich sind, daß die Stabilität der Liposomenmembran nicht mehr gewährleistet ist.

In einer Versuchsreihe wurde deshalb für den BÜCHI 190-Sprühtrockner diejenige Eingangstemperatur ermittelt, bei der gerade noch ein Sprühtrocknen einer wäßrigen Lipiddispersion möglich war, ohne daß es zur Abscheidung von Wassertröpfchen im Trockenraum kam. Der ermittelte Wert betrug 333 K (60 °C) mit der daraus resultierenden Ausgangstemperatur von 307 K (34 °C). Die maximal mögliche Pumprate belief sich auf 4,5 ml/min.

Die folgende Tabelle veranschaulicht die gefundenen Ergebnisse:

Tabelle 34 Abhängigkeit der maximalen Pumprate von der Eingangstemperatur beim Laborsprühtrockner BÜCHI 190

Eingangstemperatur	Ausgangstemperatur	Pumprate
373 K (100 °C)	318 K (45 °C)	9,6 ml/min
353 K (80 °C)	312 K (39 °C)	7,6 ml/min
343 K (70 °C)	308 K (35 °C)	5,5 ml/min
333 K (60 °C)	307 K (34 °C)	4,5 ml/min

Bei einer Eingangstemperatur von 323 K (50 °C) war die maximal mögliche Pumprate schon so gering, daß sie aus praktischen Erwägungen nicht mehr in Frage kam.

6.2.3. Liposomen in Sprüheinbettungen

In Vorversuchen konnte beobachtet werden, daß das direkte Sprühtrocknen einer Liposomendispersion unter den genannten Bedingungen nicht zu dem gewünschten pulverförmigen Produkt führte. Die getrockneten Partikel flossen, nachdem sie sich an der Wandung des Auffanggefäßes niedergeschlagen hatten, stellenweise zusammen und bildeten einen einheitlichen Lipidfilm aus. Aufgrund der klebrigen Konsistenz ließ sich das Produkt in keinem Fall zerstörungsfrei von der Wand abstreifen, um es z.B. mikroskopisch zu untersuchen.

Es mußte folglich ein Hilfsstoff gefunden werden, der, im Überschuß zusammen mit den Liposomen versprüht, das Zusammenfließen verhindern würde; eine sogenannte Sprüheinbettung wäre das Resultat. Wenn dieser Schritt gelingen sollte, wäre es weiterhin möglich zu überprüfen, ob Liposomen den Trockenprozeß während des Versprühens unbeschadet überstehen.

Da DÖLLE (21) bei seinen Versuchen über die Eignung verschiedener Hydrokolloide für Einbettungen feststellte, daß sich mit Celluloseethern - und hier vor allem mit Hydroxypropylmethylcellulose HPMC (MC E5, DOW Chemicals) - die besten Ergebnisse erzielen ließen, wurde für den genannten Versuch diese Substanz herangezogen.

In einem Vorversuch wurde reine MC E5 bei den unter 6.2.2., S. 164, beschriebenen Bedingungen aus wäßriger Lösung versprüht. Das erhaltene Produkt war, wie erwartet, amorph und hatte einen Wassergehalt von 4,3 %. Ausgehend von 3,3 % bei der kristallinen Ausgangssubstanz war der Wassergehalt durch den Sprühvorgang um 30 % gestiegen, was für die Stabilisierung der in

MC E5 eingebetteten Liposomen unter Umständen bedeutsam sein könnte.

Für die geplanten Einbettungen wurde das Verhältnis 1 : 4 (Feststoffanteil der Liposomendispersion zu MC E5) gewählt. Die entsprechende Menge MC E5 wurde in Wasser gelöst und das gleiche Volumen Liposomendispersion bereitgestellt. Beide Flüssigkeiten wurden in getrennten Schläuchen mittels einer Schlauchquetschpumpe der Zweistoffdüse zugeführt. Die Vereinigung erfolgte unmittelbar vor der Zweistoffdüse, aus der sie mittels Druckluft in die Trockenkammer gesprüht wurden. Die Sprühparameter können der folgenden Aufstellung entnommen werden.

Tabelle 35 Apparative Bedingungen und Ergebnis der Sprüheinbettung von Liposomen

Eingangstemperatur	333 K (60 ^{o}C)
Ausgangstemperatur	307 K (34 ^{o}C)
Düsendruck	2 x 10^{5} Pa (2 bar)
Düsendurchmesser	0,8 mm
Pumprate	4,5 ml/min
Ausbeute	70 %

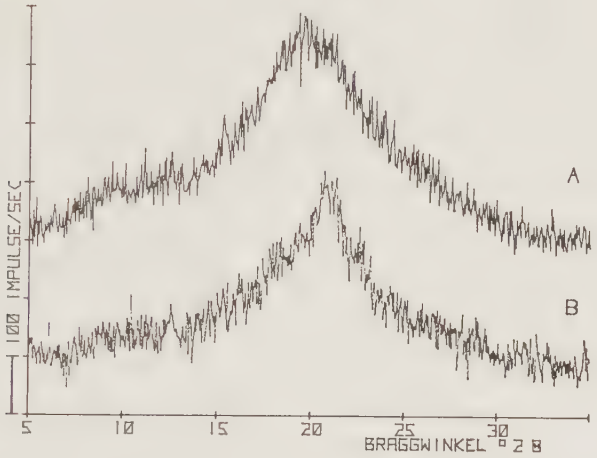
6.2.4. Eigenschaften der Liposomen-MC E5-Einbettungen (1 : 4)

Die erhaltenen Produkte wiesen weitgehend die Eigenschaften reiner sprühgetrockneter MC E5 auf: pulverförmig, weiß und geruchlos.

Unter dem Polarisationsmikroskop war der amorphe Charakter eindeutig zu erkennen.

Das gleiche Ergebnis lieferte die Röntgendiffraktometrie, wie die folgende Abbildung demonstriert.

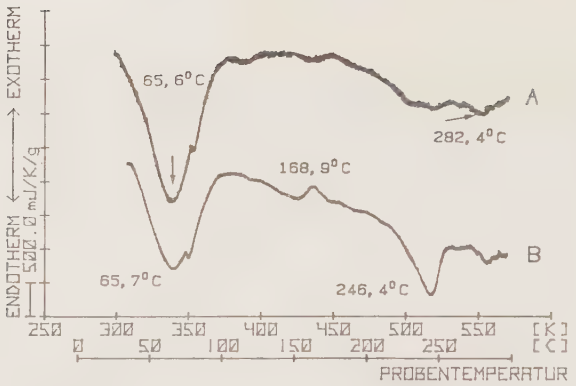
Es ist nicht verwunderlich, daß keine Reflexe auftreten, wenn man bedenkt, daß der MC-Anteil 80 % beträgt (Verhältnis Liposomen/MC E5 1 : 4).



A) NC 95-haltig B) NC 95 H-haltig

Abb. 75 Röntgendiffraktogramme der Liposomen sprüheingebettet in MC E5 (1 : 4)

Die bei der DTA erhaltenen Kurven zeigten bei beiden Sojaphosphatiden einen wenig markanten Verlauf, wie aus der folgenden Abbildung hervorgeht.



A) NC 95-haltig B) NC 95 H-haltig

Abb. 76 DTA-Aufnahmen der Liposomen sprüheingebettet in MC E5 (1 : 4)

In beiden Fällen tritt im Bereich von 338 K (65 °C) ein ausgeprägter endothermer Peak mit Schulter an der aufsteigenden Flanke auf, der die Wasserabgabe der Präparate anzeigt. Die Kurve der NC 95 H-haltigen Einbettung weist weiterhin einen exothermen Peak bei 441,9 K (168,9 °C) und schließlich einen endothermen bei 519,4 K (246,4 °C) auf, der das Schmelzen des Phospholipids angibt. Beim NC 95-haltigen Präparat sind vergleichbare Signale weit weniger deutlich ausgeprägt.

Der mittels TG ermittelte Wassergehalt betrug bei den NC 95- und NC 95 H-haltigen Produkten einheitlich 4,4 %.

Der nächste Abschnitt stellt das Verhalten der Einbettungen in Wasser dar.

6.2.5. Verhalten der Liposomen-MC E5-Einbettungen bei der Dispergierung in Wasser

In Bezug auf die erhaltenen Produkte waren im wesentlichen zwei Fragen zu stellen:

1. Überstehen Liposomen den Sprühvorgang unbeschadet, und falls dieser Fall ist,
2. wie hoch ist der Anteil der noch intakten Liposomen?

Zur Klärung der ersten Frage wurde das Präparat nach Zusatz eines Tropfens Wasser unter dem Mikroskop betrachtet. An der sich fortbewegenden Grenzfläche fest/flüssig konnte der "Auflösungsvorgang" gut beobachtet werden: die ursprünglich kugelförmigen Partikel des Sprühprodukts lagerten sich zunächst zu größeren Gebilden zusammen (s. Abb. 77A, S. 170), um dann nach ca. 15 Sekunden in der weiterlaufenden Wasserfront zu desaggregieren (s. Abb. 77B, S. 170).

Es resultierten nach ca. 30 Sekunden kleinere runde Partikel mit einem Durchmesser von etwa 3 µm, die während der Mikroskopierdauer von einer halben Stunde stabil blieben: die Liposomen.

Es stellte sich nun die Frage, ob die Liposomendispersionen ihren Liposomengehalt trotz Sprühtrocknungsvorgang beibehalten haben. Dazu wurden 100 mg Sprüheinbettung in einem Reagenzglas mit 10 ml einer 8 mmol $CaCl_2$-Lösung schnell in "Lösung" gebracht, sofort danach bei 10.000 g abzentrifugiert und der Digoxigeningehalt mittels HPLC im klaren Oberstand bestimmt. Im Falle der NC 95-Liposomen betrug der ermittelte Wert 18,4 % des Gehalts, im Falle der NC 95 H-Liposomen 13,1 % (vgl. Tab. 33, S. 160).

Die folgende Tabelle stellt die ermittelten Werte gegenüber.

Tabelle 36 Liposomal eingeschlossenes Digoxigenin pro 10 ml Liposomendispersion

	vor Sprüheinbettung	nach Sprüheinbettung
NC 95	15,8 mg	12,9 mg
NC 95 H	13,9 mg	12,1 mg

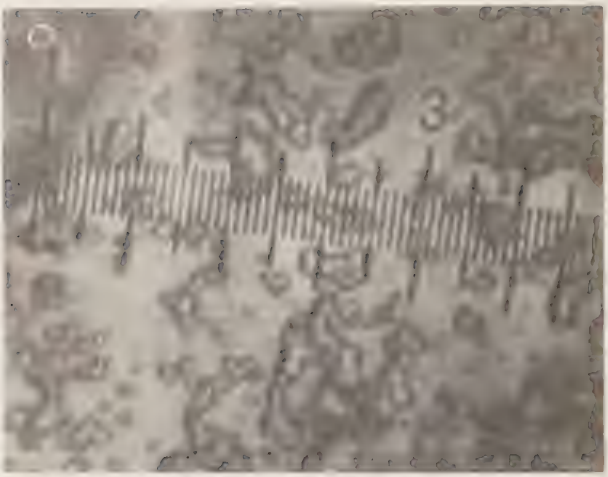
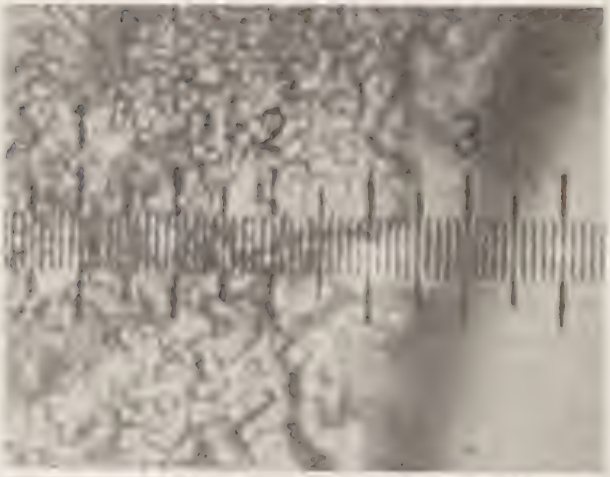


Abb. 77

Polarisationsmikroskopische Aufnahmen von Liposomen (NC 95)-Sprüheinbettungen in MC E5 bei Benetzung mit Wasser

A: nach ca. 5 Sekunden

⟷ 100 µm



B: nach ca. 15 Sekunden

⟷ 100 µm

C: nach ca. 30 Sekunden

5 µm

Durch dieses Ergebnis wird bestätigt, was schon unter 6.1.4., S. 153, gesagt wurde: Liposomen, die aus einem gesättigten Phospholipid bestehen, sind in der Lage inkorporiertes Digoxigenin fester einzulagern als solche, die aus ungesättigten Phospholipiden aufgebaut sind.

Zum anderen wurde bewiesen, daß Liposomen unter den beschriebenen Bedingungen den Sprühtrocknungsprozeß weitgehend unbeschadet überstehen.

Der aus der Schädigung resultierende Nachteil soll allerdings nicht unerwähnt bleiben: Die Einbettung enthält nicht nur intakte, sondern auch die Bestandteile der defekten Liposomen, die sich ohne Zerstörung des gesamten Systems nicht mehr selektiv entfernen lassen.

Im folgenden Abschnitt soll nun das Freisetzungsverhalten der Liposomeneinbettungen näher untersucht werden.

6.2.6. Freisetzung der Liposomen-MC-Einbettungen unter SINK-Bedingungen

Freisetzung unter SINK-Bedingungen bedeutet, daß die in Lösung ermittelte Konzentration maximal 10 % der Sättigungslöslichkeit der betreffenden Substanz erreichen darf (181). Diese Forderung bezüglich des Digoxigeningehalts wurde bei der Einwaage der verschiedenen Präparate berücksichtigt.

Anwendung fand eine in unserem Arbeitskreis gebräuchliche Apparatur (vgl. 5.3.2., S. 112). Die Auflösung der zu untersuchenden Produkte erfolgt in einem 100 ml-Rundkolben mit abgeflachtem Boden. Der Inhalt des Kolbens wird durch einen Magnetrührstab kontinuierlich gerührt und durch ein umgebendes Wasserbad temperiert. Mittels einer Schlauchquetschpumpe wird er durch ein Glaswolle-Filter und eine Fritte in eine Küvette und von dort wieder zurück in den Kolben gepumpt. Die Probenentnahme für die HPLC erfolgt aus dieser Küvette.

Tabelle 37 Freisetzungsbedingungen

Inkubationsmedium	:	H_2O von 310 K (37 °C)
Volumen	:	100 ml
Rührgeschwindigkeit	:	200 U/min
Pumprate	:	15 ml/min
Einwaage	:	entsprach jeweils 1,3 mg Digoxigenin

6.2.7. Ergebnisse der Freisetzungsprüfungen

Die folgende Abbildung zeigt die unter den genannten Bedingungen (vgl. Tab. 37, S. 172) erhaltenen Auflösungskurven der Liposomen-MC-Einbettungen im Vergleich zu kristallinem Digoxigenin.

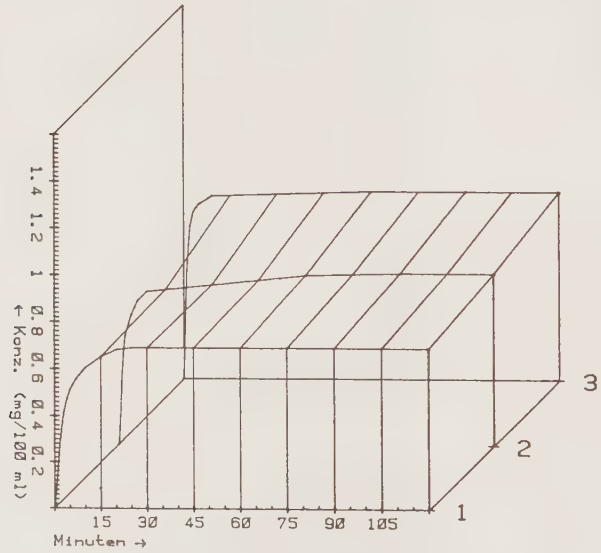


Abb. 78 Freisetzungskurven (SINK-Bedingungen)

1 Digoxigenin kristallin
2 Liposomeneinbettung in MC E5 (NC 95 H-haltig)
3 Liposomeneinbettung in MC E5 (NC 95-haltig)

Während letzteres nach 2 Stunden eine Endkonzentration von 0,52 mg/100 ml aufweist, erreicht die NC 95 H-haltige Liposomeneinbettung 0,59 mg/100 ml und die NC 95-haltige sogar 0,69 mg/100 ml. Des weiteren fällt auf, daß der Konzentrationsanstieg bei den Einbettungen schneller erfolgt, als bei der kristallinen Substanz.

Diese Ergebnisse zeigen, daß sich mit Hilfe sprüheingebetteter Liposomen eine Steigerung der Lösungseigenschaften von Digoxigenin unter in-vitro-Bedingungen erzielen läßt.

In diesem Zusammenhang interessierte aber nun die Frage, wie sich diese neue Zubereitungsform im Vergleich zu den bisher eingesetzten Kolloideinbettungen bezüglich des Freisetzungsverhaltens verhält. Daneben sollte auch geprüft werden, wie sich Sprühtrocknungsprodukte verhalten, die aus den gleichen Komponenten wie die Liposomen-MC-Einbettungen bestehen.

Auf diese Weise ließe sich differenzieren, welcher Einfluß einerseits von den Komponenten und andererseits von den verschiedenen Verfahrenstechniken auf das Freisetzungsverhalten ausgeht. Die Herstellung und Prüfung solcher Vergleichspräparate wird in den folgenden Abschnitten besprochen.

6.3. Vergleichende Prüfung der Liposomeneinbettungen

6.3.1. Sprühtrocknungsprodukte ohne vorherige Liposomengewinnung

Die Liposomenkomponenten (Digoxigenin, Cholesterol, Sojaphosphatid) wurden nach zwei unterschiedlichen Verfahren mit MC E5 in eine Sprüheinbettung überführt:

A) durch Versprühen aus einem $CHCl_3/CH_3OH$-Gemisch (2 : 1) und

B) durch Versprühen aus wäßriger Dispersion.

Alle Bestandteile - mit Ausnahme der MC - wurden in wenig Methanol gelöst und in einem Wasserüberschuß ausgefällt. Die MC wurde separat in Wasser gelöst. Beide Lösungen wurden erst unmittelbar vor dem Versprühen vereinigt.

Ein dritter Ansatz wurde ohne Tensidzusatz durchgeführt, d.h.

C) es wurde lediglich Digoxigenin und MC E5 aus $CHCl_3/CH_3OH$ (2 : 1) versprüht.

Bei der Herstellung dieser Sprühtrocknungsprodukte wurde das unterschiedliche Einschließungsvermögen der NC 95- und NC 95 H-haltigen Liposomen für Digoxigenin berücksichtigt (vgl. 6.1.7., S. 159).

In der folgenden Tabelle sind die Zusammensetzungen der einzelnen Präparate aufgelistet.

Tabelle 38 Zusammensetzung der Vergleichspräparate

A) NC 95-haltige

	A (mg)	B (mg)	C (mg)
Digoxigenin	40,0	40,0	40,0
Cholesterol	39,0	39,0	-
Sojaphosphatid NC 95	267,0	267,0	-
MC E5	1384,0	1384,0	1384,0
	1730,0	1730,0	1424,0

B) NC 95 H-haltige

Digoxigenin	35,0	35,0	35,0
Cholesterol	39,0	39,0	-
Sojaphosphatid NC 95 H	267,0	267,0	-
MC E5	1364,0	1364,0	1364,0
	1705,0	1705,0	1399,0

6.3.2. Verhalten der Vergleichspräparate in Wasser

Große Bedeutung kam der Frage zu, wie sich die Komponenteneinbettungen in Wasser verhalten: es mußte geprüft werden, ob sich nach der Dispergierung der Einbettungen in Wasser eventuell Liposomen ausbilden.

Das hätte zur Folge, daß die vorherige Herstellung von Liposomen überflüssig wäre, zumal dieses Verfahren relativ aufwendig ist.

Für den Fall, daß sich keine Liposomen ausbilden, war es wichtig zu überprüfen, welches System - Liposomen- oder Komponenteneinbettung - das bessere Freisetzungsverhalten aufweist.

Die Untersuchungen wurden mikroskopisch durchgeführt wie bei den Liposomeneinbettungen (vgl. 6.2.5., S. 169). Auch hier lagerten sich die ursprünglich kugelförmigen Partikel unter dem Einfluß der nahenden Wasserfront zu größeren Einheiten zusammen, die dann in Wasser sofort zerfielen. Das Auftreten von runden Formkörpern, die die Ausbildung von Liposomen signalisiert hätten, war in keinem Fall zu beobachten.

In diesem Zusammenhang interessierte die Frage, in welcher Weise sich ein Kolloidzusatz (MC E5) auf die Liposomenbildung im Zuge der Herstellung auswirkt.

Unter dem Mikroskop zeigte sich, daß sich in reinem Wasser erwartungsgemäß Liposomen ausbilden. In einer 0,25proz. MC E5-Lösung jedoch war ihr Anteil schon drastisch reduziert und in einer 0,5proz. waren keine Liposomen mehr zu erkennen.

Das bedeutet in anderen Worten: Liposomendispersionen werden durch Kolloidzusatz nicht zerstört. Die Ausbildung von Liposomen in Kolloidlösungen dagegen ist nicht möglich.

In den folgenden Abschnitten soll nun das in-vitro-Freisetzungsverhalten der einzelnen Präparate verglichen werden. Die Prüfungen wurden sowohl unter SINK-, als auch unter NON-SINK-Bedingungen durchgeführt. Die Konzentrationsbestimmungen für Digoxigenin erfolgten diskontinuierlich mit Hilfe der HPLC über eine Eichgerade.

6.3.3. Ergebnisse der Freisetzungsprüfungen unter SINK-Bedingungen

Abbildung 79 zeigt die unter den bereits erwähnten Bedingungen (vgl. 6.2.6., S. 171) erhaltenen Auflösungskurven der mit Sojaphosphatid NC 95 hergestellten Sprüheinbettungen im Vergleich mit kristallinem Digoxigenin und dessen Sprüheinbettung in MC-E5.

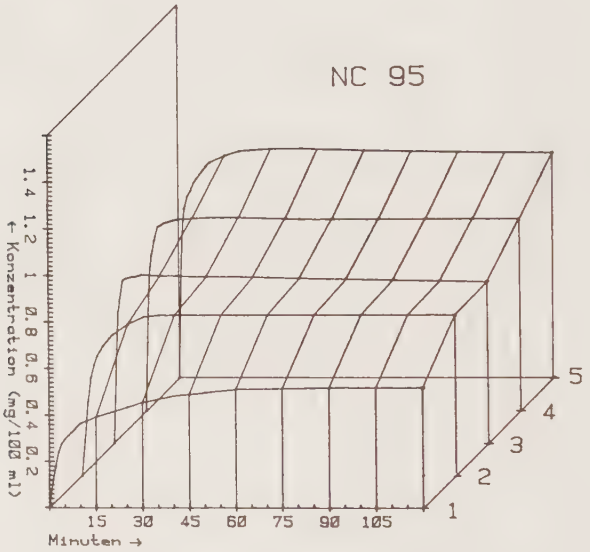


Abb. 79 Freisetzungskurven (SINK-Bedingungen) von:

1) Digoxigenin kristallin
2) Digoxigenin/MC E5 1 : 35
3) Liposomeneinbettung in MC E5
4) Liposomenkomponenten aus wäßriger Dispersion
5) Liposomenkomponenten aus $CHCl_3/CH_3OH$

Es fällt auf, daß die Liposomeneinbettung (Kurve 3) weitaus niedrigere Endwerte nach 2 Stunden Freisetzung aufweist als die Sprüheinbettungen der Liposomenkomponenten (Kurven 4 und 5). So wird nur eine Konzentration von 0,69 mg/100 ml im Gegensatz

zu 0,82 und 0,96 mg/100 ml erreicht. Wie schon erwähnt (vgl. 6.3.2., S. 175) bilden die Komponenteneinbettungen in Wasser keine Liposomen aus. Die enthaltenen Tenside stehen somit ausschließlich zur Lösungsvermittlung zur Verfügung. Die besondere Anordnung der Phospholipide in Liposomen hat bei in-vitro-Freisetzungen also keine Bedeutung. Entscheidend ist die molekulardisperse Verteilung, wie sie in den Komponentensprüheinbettungen gegeben ist. Allerdings ist ein schneller Konzentrationsanstieg bei den drei Kurven in gleicher Weise ausgeprägt.

Der Unterschied zwischen den Kurven 4 und 5 dürfte auf dem Phänomen beruhen, daß nur ursprünglich vollständig gelöste Substanzen sich durch einen Sprühtrocknungsprozeß in den vollamorphen Zustand überführen lassen, wie das im Falle der Kurve 5 durch Versprühen aus $CHCl_3/CH_3OH$ 2 : 1 geschehen ist. Bei schlecht wasserlöslichen Substanzen bewirkt der vollamorphe Zustand gegenüber dem teilamorphen oder kristallinen eine Verbesserung der Lösungseigenschaften, wie in unserem Arbeitskreis nachgewiesen werden konnte. Bei dem der Kurve 4 zugrundeliegenden Präparat wurden alle Komponenten - bis auf die MC E5 - als Suspension versprüht, was nach DÖLLE (21) nicht zu einem vollamorphen Produkt führt.

Bemerkenswerterweise erreicht die Sprüheinbettung von Digoxigenin in MC E5 (Kurve 2) nach 2 Stunden den gleichen Endwert wie die Liposomeneinbettung (Kurve 3), nämlich 0,69 mg/100 ml. Dieses überraschende Ergebnis weist darauf hin, daß der vollamorphe Zustand der Sprüheinbettung (Kurve 2) mit den durch MC E5 stabilisierten Liposomeneigenschaften im Falle des NC 95 bezüglich des Lösungsverhaltens gleichzusetzen ist, d.h. eine vorherige Bereitung von digoxigeninhaltigen Liposomen mit nachfolgender Einbettung bringt keine Vorteile gegenüber einer Digoxigenin-MC E5-Sprüheinbettung. Der einzige Unterschied zwischen den beiden Kurven besteht darin, daß die Kurve 3, die Liposomeneinbettung, bedingt durch die Anwesenheit des lösungsvermittelnden Lecithins, steiler ansteigt als die Kurve 2. Daß dieser Einfluß noch gesteigert werden kann, zeigt der Vergleich der Kurven 2

und 4: in beiden Fällen liegt MC E5, bedingt durch den Sprühvorgang, amorph vor. Das Digoxigenin ist aber nur im ersten Fall vollamorph, während es im zweiten allenfalls teilamorph vorliegen dürfte.

Das molekulardispers verteilte ursprünglich kristalline Lecithin (solid solution) vermag also in ausgeprägter Weise die Löslichkeit des kristallinen Digoxigenins zu steigern.

Die molekulardisperse Verteilung scheint auch dem Ordnungszustand der Liposomen unter den von uns gewählten Bedingungen überlegen zu sein, was die Steigerung der Kurven 4 und 5 gegenüber 3 deutlich macht.

Im Prinzip lassen sich die eben beschriebenen Feststellungen auch auf die mit Sojaphosphatid NC 95 H hergestellten Sprühprodukte übertragen.

Es fällt aber auf, daß die Liposomeneinbettung (Kurve 3) mit einem Endwert von 0,59 mg/100 ml nach 2 Stunden deutlich unter dem der Sprüheinbettung (Kurve 2) mit 0,69 mg/100 ml liegt (vgl. Abb. 80, S. 179).

Die NC 95 H-haltigen Produkte (Kurven 3 bis 5) liefern nämlich jeweils ein niedrigeres Kurvenniveau als die korrespondierenden NC 95-haltigen, was der direkte Vergleich in Abbildung 81 (S. 179) deutlich macht.

Das Sojaphosphatid NC 95 H ist folglich im Hinblick auf diese Ergebnisse schlechter zu bewerten als das Sojaphosphatid NC 95.

Deutlich wird dies auch in der folgenden Tabelle 39, S. 180, die die von den einzelnen Präparationen erreichten Konzentrationswerte zusammenfaßt.

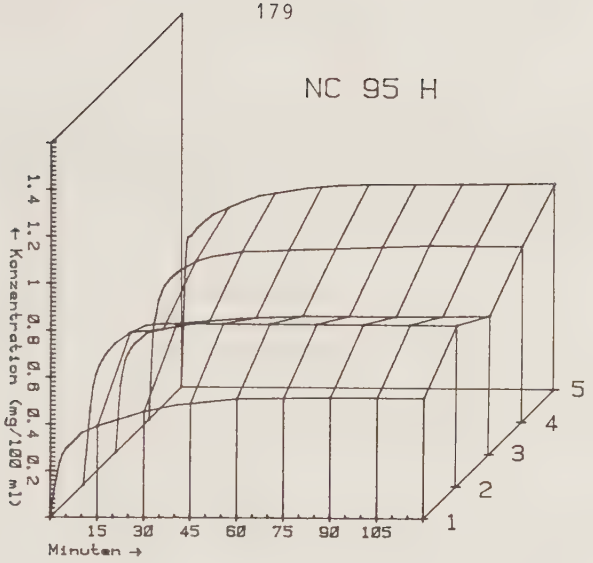


Abb. 80 Freisetzungskurven (SINK-Bedingungen) von
1) Digoxigenin kristallin
2) Digoxigenin/MC E5 1 : 39
3) Liposomeneinbettung in MC E5
4) Komponenten aus wäßriger Dispersion
5) Komponenten aus $CHCl_3/CH_3OH$

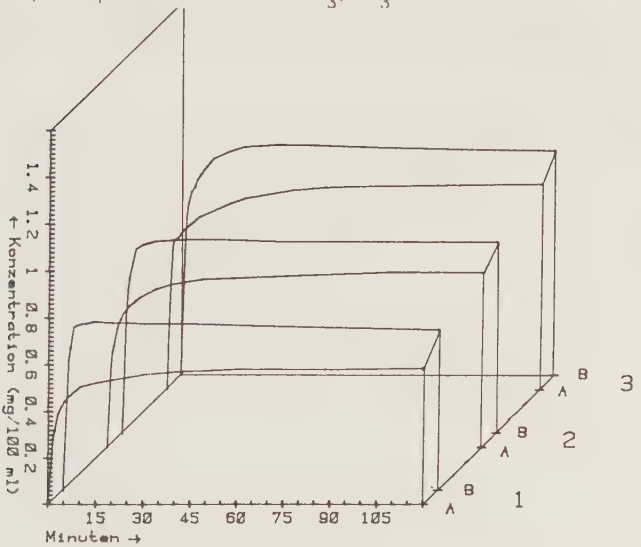


Abb. 81 Freisetzungskurven (SINK-Bedingungen) der Phospholipid-haltigen Präparate: A: NC 95 H, B: NC 95
1: Liposomeneinbettung in MC E5
2: Komponenten aus wäßriger Dispersion
3: Komponenten aus $CHCl_3/CH_3OH$

Tabelle 39 Zusammenhang zwischen dem Ordnungszustand des Digoxigenins in den jeweiligen Proben und den erreichten Konzentrationen nach 2 Stunden

Probe	Ordnungszustand von Digoxigenin	Konzentrationen nach 2 Std. in H_2O (37 °C) (mg/100 ml)	
1 Digoxigenin	kristallin	0,52	
2 Digoxigenin/MC E5-Einbettungen	amorph	0,69	
		NC 95	NC 95 H
3 Liposomeneinbettung in MC E5	kristallin	0,69	0,59
4 Komponenten aus wäßr. Dispersion	teilamorph	0,82	0,75
5 Komponenten aus $CHCl_3/CH_3OH$	amorph	0,96	0,88

6.3.4. Freisetzung in Phospholipid/Cholesterol-haltigen Lösungen

Die Freisetzungseigenschaften der Komponenteneinbettungen stellten eindeutig den Steigerungseffekt heraus, der sich durch den Zusatz von Tensiden gegenüber herkömmlichen Kolloid-Sprüheinbettungen erzielen läßt. An diesem Punkt war allerdings noch nicht klar, in welchem Umfang Tensid- und Kolloidgehalt jeweils zum Gesamtergebnis beitragen.

Aus diesem Grunde schienen folgende Freisetzungsprüfungen notwendig:

Freisetzung einer Einbettung von Digoxigenin mit

1) Phospholipid/Cholesterol in einer MC E5-Lösung als Inkubationsmedium und mit
2) MC E5 in einer Phospholipid/Cholesterol-haltigen Inkubationslösung.

In der Praxis ließ sich diese Versuchsplanung jedoch nur teilweise realisieren: Eine Digoxigenin-Phospholipid-Cholesterol-Sprüheinbettung kann nicht gewonnen werden, da die Tenside aufgrund ihrer wachsartigen Konsistenz keine pulverförmigen Produkte ergeben (vgl. 6.2.3., S. 165).

Der zweite Punkt hingegen konnte praktisch untersucht werden. Da die Phospholipide und vor allem Cholesterol schwer wasserlöslich sind, wurden sie in Ether gelöst und in dieser Form ins Freisetzungsmedium (Wasser) eingebracht. Nach dem vollständigen Abdampfen des Ethers wurde eine feine weiße Trübung festgestellt, die auf ausgefallenes Cholesterol zurückzuführen war.

In der folgenden Tabelle ist die Zusammensetzung und die Herstellung der Phospholipid/Cholesterol-Lösung dargestellt.

Tabelle 40 Zusammensetzung* der tensidhaltigen Inkubationsmedien

	1	2
Cholesterol	1,3 mg	1,5 mg
NC 95	8,7 mg	-
NC 95 H	-	9,9 mg

1 bzw. 2 in 10 ml Ether lösen und in 100 ml Wasser geben, Ether abdampfen.

* Die angegebenen Mengen beziehen sich auf die in den Liposomeneinbettungen vorliegenden Konzentrationsverhältnisse

Im übrigen gelten die in Tabelle 37, S. 172, zusammengefaßten Freisetzungsparameter.

Die folgende Abbildung zeigt die erhaltenen Freisetzungskurven der MC E5-Sprüheinbettungen nach Inkubation in den Phospholipid-haltigen Inkubationsmedien und in Wasser.

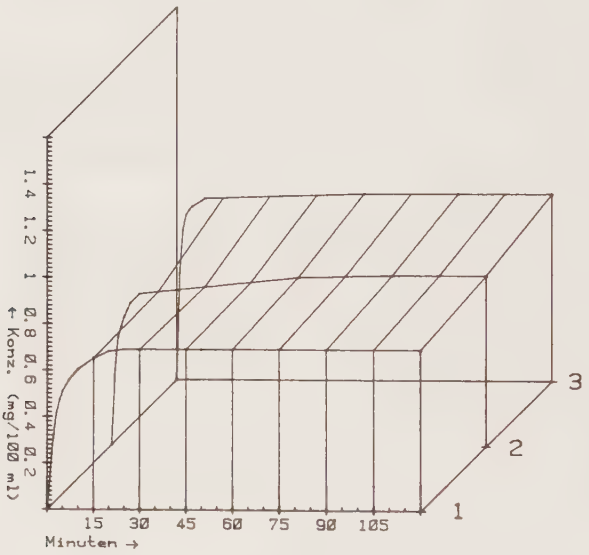


Abb. 82 Freisetzungskurven (SINK-Bedingungen) von Digoxigenin/MC E5-Einbettungen in

1) Wasser
2) NC 95 H-haltiger Lösung
3) NC 95-haltiger Lösung

Die erreichten Konzentrationen betragen nach zwei Stunden im Falle der NC 95-haltigen Lösung 0,80 mg/100 ml (Kurve 3) und im Falle der NC 95 H-haltigen 0,73 mg/100 ml (Kurve 2). Das bedeutet, daß nahezu der gleiche Endwert wie bei den jeweiligen Komponenteneinbettungen (0,82 und 0,75 mg/100 ml) erreicht wurde.

In der folgenden Tabelle 41 sind die von den MC E5-Einbettungen erzielten Konzentrationen zusammengefaßt.

Tabelle 41 Erzielte Endkonzentrationen der verschiedenen Präparationen bezogen auf die kristalline Ausgangssubstanz

Präparat	Freisetzungsmedium	Endkonzentration (mg/100 ml)	erzielter Steigerungsgrad gegenüber kristallinem Digoxigenin
1) Digoxigenin/MC E5			
1 : 35 bzw. 1 : 39	Wasser	0,69	32,7 %
2) 1 : 35	NC 95-haltige Lösung	0,80	53,8 %
3) 1 : 39	NC 95H-haltige Lösung	0,73	40,4 %
zum Vergleich:			
Liposomenkomponenten versprüht aus			
1) wäßriger Disperion			
NC 95-haltig	Wasser	0,82	57,7 %
NC 95 H-haltig	Wasser	0,75	44,2 %
2) $CHCl_3/CH_3OH$			
NC 95-haltig	Wasser	0,96	84,6 %
NC 95 H-haltig	Wasser	0,88	69,2 %

Diese Werte machen zweierlei deutlich:

- Durch einen Tensidzusatz lassen sich noch Steigerungen gegenüber den herkömmlichen kolloidhaltigen Sprüheinbettungen erzielen.
- Wenn die Tenside zusammen mit den Kolloiden versprüht werden, fällt diese Steigerung viel deutlicher aus, als wenn die Tenside im Freisetzungsmedium dispergiert vorliegen. Der Sprühvorgang ist folglich von entscheidender Bedeutung.

Zur Abrundung der Erkenntnisse wird im folgenden Abschnitt auf Freisetzungsprüfungen unter NON-SINK-Bedingungen eingegangen.

6.3.5. Freisetzung unter NON-SINK-Bedingungen

Auf die Bedeutung übersättigter Lösungen und deren Stabilisierung mit makromolekularen Stoffen wurde in unserem Arbeitskreis schon verschiedentlich hingewiesen (131,182,183).

Zur Quantifizierung des Übersättigungseffekts dient der sogenannte Übersättigungsquotient Q, d.h. der Quotient aus der gemessenen Konzentration der zu charakterisierenden Substanz und der Konzentration einer Referenzsubstanz, i.a. der kristallinen Ausgangsform in mg/100 ml zum Zeitpunkt t (179).

Er wird im allgemeinen in der Weise bestimmt, daß man ein Vielfaches der Sättigungskonzentration im Untersuchungsmedium, i.a. Wasser von 310 K (37 °C), dispergiert und die resultierende Konzentration unter geeigneten Bedingungen mißt. Ein solches Vorgehen entspricht einer Freisetzung unter NON-SINK-Bedingungen.

Die für die unter SINK-Bedingungen durchgeführte Freisetzung eingesetzte Apparatur war hierfür nicht geeignet, da die MC E5-Konzentrationen so hoch waren, daß sie infolge der hohen Viskosität nicht mehr umpumpbar waren.

Aus diesem Grunde wurde auf ein Verfahren zurückgegriffen, das NYBERG für die vergleichende Untersuchung von Digoxin-Tabletten eingeführt hatte (180). Für unsere Aufgabenstellung mußte es geringfügig modifiziert werden.

In ein 20 ml Reagenzglas wurden 5,0 ml Wasser von 310 K (37 °C) vorgelegt. Zu diesem Volumen wurde die entsprechende Menge an Sprüheinbettung gegeben, um rein rechnerisch eine fünffache Übersättigung, bezogen auf Digoxigenin, also 65,0 mg/100 ml, zu erreichen. Danach wurde der Ansatz sofort 60 Sekunden auf einem Reagenzglasschüttler durchgemischt und anschließend filtriert. Das klare Filtrat wurde im Verhältnis 1 : 1 mit Methanol versetzt und die Konzentration mittels HPLC bestimmt.

6.3.6. Ergebnisse

Die ermittelten Obersättigungsquotienten finden sich in Abbildung 83. Als Bezugsgrößen fungieren wieder die Werte für kristallines Digoxigenin und dessen Sprüheinbettung in MC E5.

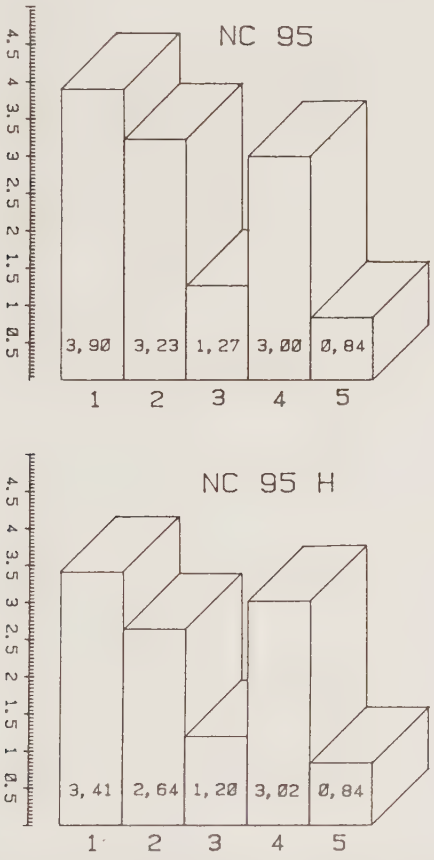


Abb. 83 Ermittelte Übersättigungsquotienten der
1: Liposomenkomponenten aus $CHCl_3/CH_3OH$
2: Liposomenkomponenten aus wäßriger Dispersion
3: Liposomeneinbettungen in MC E5
4: Digoxigenin-MC E5-Einbettungen und von
5: Digoxigenin kristallin

Das Ergebnis ähnelt dem unter SINK-Bedingungen ermittelten. Es fällt aber auf, daß der Unterschied zwischen Liposomeneinbettungen und jeweils korrespondierenden Komponenteneinbettungen weitaus deutlicher hervortritt.

So liegen erstere mit den Werten 1,27 und 1,20 nur unwesentlich über dem Wert von 0,84 für kristallines Digoxigenin.

Dagegen bewegt sich die Digoxigenin/MC E5-Sprüheinbettung mit dem Faktor 3,0 im Bereich der Komponenteneinbettungen. Die NC-95 H-haltigen liegen mit 3,41 und 2,64 wieder deutlich unter den Werten der NC 95-haltigen Einbettungen mit 3,90 und 3,23.

Auch hier zeigt sich, daß vollständig amorphe Produkte (1 und 4) höhere Übersättigungen bewirken als teilamorphe (2 und 3). Der steigernde Einfluß durch Lecithin ist beim Vergleich zwischen 1 und 4 unübersehbar.

6.4. Zusammenfassung

Die in diesem Kapitel ermittelten Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- Aus den Sojaphosphatiden NC 95 bzw. NC 95 H und Cholesterol lassen sich digoxigeninhaltige Liposomen gewinnen.
- Durch Sprühtrocknung unter milden Bedingungen können diese Liposomen unter Zusatz von MC E5 in Sprüheinbettungen überführt werden (Verhältnis 1 : 4).
- Bei der Redispergierung des erhaltenen pulverförmigen Produkts in Wasser kann die Wiederfreigabe von Liposomen beobachtet werden.
- Bei der Sprühtrocknung der Komponenten, aus denen die Liposomeneinbettungen zusammengesetzt sind, resultieren ebenfalls pulverförmige Produkte.
- Nach der Zugabe von Wasser kann die Ausbildung von Liposomen nicht festgestellt werden.

- Die Komponenteneinbettungen zeigen bei in-vitro-Freisetzungsprüfungen unter SINK-Bedingungen deutlich erhöhte Endkonzentrationen im Vergleich zu den bisher eingesetzten tensidfreien Kolloideinbettungen.
- Dieser Steigerungseffekt ist sowohl auf die Anwesenheit der Phospholipide als auch auf den Verteilungsgrad im Kolloid zurückzuführen.
- Liposomeneinbettungen weisen ein relativ schlechtes Freisetzungsverhalten auf.
- Die Obersättigungsfaktoren sind bei den Komponenteneinbettungen am höchsten.

Der Befund, daß Liposomeneinbettungen den Komponenteneinbettungen unterlegen sind, sagt nichts über ihr Verhalten in vivo aus. Liposomen mit eingeschlossenem Arzneistoff können ihre besonderen Eigenschaften, die sie gegenüber dem reinen Arzneistoff im Metabolismusgeschehen des Organismus auszeichnen, nur unter physiologischen Bedingungen voll entfalten (147).

Erst eine solche Untersuchung, die im Rahmen einer Nachfolgearbeit durchgeführt werden könnte, wird endgültig aussagen, welcher Stellenwert sprüheingebetteten Liposomen zukommen kann (142).

7. Zusammenfassung der Arbeit

Digoxigenin, das Aglykon des Digoxins, ist aufgrund seines Molekülaufbaus den Steroiden zuzurechnen. Da die Substanz bisher in der pharmazeutischen Praxis keine Anwendung findet, lassen sich Angaben zu den Eigenschaften nur in chemisch orientierten Nachschlagewerken finden. Die vorgefundenen widersprüchlichen Angaben sind Anlaß für eigene physikalisch-chemische Untersuchungen, die v.a. mittels Differentialthermoanalyse, Röntgendiffraktometrie, Polarisationsmikroskopie und Thermogravimetrie durchgeführt werden. Als Untersuchungsmaterial stehen drei Muster verschiedener Herkunft zur Verfügung, die sich bei DTA-Untersuchungen unterschiedlich verhalten.

Nach Ausfällung in Wasser resultiert allerdings ein einheitliches Produkt, das einen Wassergehalt von 4,4 % aufweist. Umfangreiche Versuche erbringen den Nachweis, daß dieses Wasser nicht sorptiv, sondern in Form eines Monohydrates gebunden vorliegt. Bemerkenswerterweise kann das Hydratwasser bei geringfügiger Temperaturerhöhung über Raumtemperatur vollständig entzogen werden, obwohl das Maximum der Abgabe, das bei DTA- und TG-Untersuchungen festgestellt werden kann, bei ca. 373 K (100 ^{o}C) liegt. Aus dem Anhydrat bildet sich an der Luft bei Raumtemperatur und mittlerer Feuchte wieder schnell das Monohydrat.

Durch Sprühtrocknung und - bei Einhaltung bestimmter Bedingungen - durch Rotationsverdampfung läßt sich Digoxigenin in ein vollamorphes Produkt überführen. In dieser Form ist es aber nicht stabil, sondern rekristallisiert langsam in Form des Monohydrates. Durch molekulardisperse Einbettung in Hydrokolloide läßt sich dieser Umwandlungsprozeß inhibieren. Zum Beispiel zeigt eine Digoxigenin-MC E5-Sprüheinbettung (1 : 9) auch noch nach 3 Jahren Lagerdauer keine Anzeichen von Kristallisation.

Bei DTA-Untersuchungen des reinen amorphen Produkts stellt man fest, daß Digoxigenin beim Aufheizen kristallisiert und um 10 K höher schmilzt als das Monohydrat. Das gleiche Resultat erzielt man bei sprühgetrockneten Proben, die zusätzlich gemahlen werden. Die Ausbildung parakristalliner Zustände wie bei Digoxin läßt sich nicht feststellen.

Mahlversuche mit dem kristallinen Digoxigenin bestätigen den Hinweis auf das Vorliegen einer zweiten Modifikation. Mittels RD wird festgestellt, daß die tribomechanische Behandlung nicht zu amorphen, sondern nur zu teilamorphen Produkten führt. Bei DTA-Untersuchungen erkennt man das Vorliegen des unveränderten Ausgangsmaterials und der neuen höher schmelzenden Form nebeneinander. Mit zunehmender Mahldauer nimmt der Anteil der letzteren Form zu, ohne daß eine vollständige Überführung möglich ist.

In reiner Form läßt sich die höher schmelzende Form durch Kristallisation aus Acetonitril oder Dimethylformamid gewinnen. Die Kristallisationsversuche erbringen den Nachweis für das Vorliegen einer Polymorphie beim Digoxigenin: die höher schmelzende Modifikation wird im Folgenden deshalb mit I und die niedriger schmelzende mit II bezeichnet. Ein unterschiedliches Auflösungsverhalten in Wasser und differierende Schmelzenthalpien - mittels Differential Scanning Calorimetry ermittelt - bekräftigen den Befund.

Untersuchungen zum thermodynamischen Verhalten der beiden Modifikationen zeigen das Vorliegen einer Enantiotropie. Modifikation II stellt hierbei die bei Raumtemperatur stabile Form dar, weswegen nur sie für den Einsatz in pharmazeutischen Zubereitungen geeignet ist. Durch Bestimmung der Sättigungslöslichkeiten bei steigenden Temperaturen nach KUHNERT-BRANDSTÄTTER läßt sich der exakte Umwandlungspunkt für Modifikation I und II ermitteln.

Im zweiten Teil der Arbeit wird untersucht, ob und unter welchen Bedingungen sich Digoxigenin in Liposomen aus Sojaphospha-

tiden und Cholesterol einschließen läßt. Zur Verfügung stehen ein Sojaphosphatid, das auch ungesättigte Fettsäurereste enthält (NC 95) und eines, das ausschließlich gesättigte (NC 95 H) enthält. Unter Einhaltung bestimmter Bedingungen lassen sich in beiden Fällen digoxigeninhaltige Liposomen gewinnen, wobei sich zeigt, daß das gesättigte Sojaphosphatid zwar stabilere Liposomen liefert, aber daß das Einschließungsvermögen dieser Liposomen für Digoxigenin geringer ist.

Im Hinblick auf die Herstellung fester, liposomenhaltiger Arzneiformen muß eine Oberführung in die Pulverform vorgenommen werden. Dazu werden eine frisch hergestellte Liposomendispersion und eine wäßrige Celluloseether-Lösung (MC E5) im Verhältnis 1 : 4 sprühgetrocknet. Beim Dispergieren der erhaltenen Sprüheinbettungen in Wasser werden wieder intakte Lipsomen freigesetzt.

Die Untersuchung des in-vitro-Freisetzungsverhaltens in Wasser unter SINK-Bedingungen ergibt, daß die Liposomeneinbettungen zwar höhere Endkonzentrationen erreichen als kristallines Digoxigenin, aber herkömmlichen Kolloidsprüheinbettungen nicht überlegen sind. Sprühtrocknungsprodukte aus den Komponenten der Liposomeneinbettungen führen bei der Freisetzung in Wasser hingegen zu einer weiteren Konzentrationssteigerung. Beim Kontakt mit Wasser bilden diese Produkte keine Liposomen aus.

Freisetzungsprüfungen unter NON-SINK-Bedingungen, die der Bestimmung des Übersättigungsquotienten dienen, führen zu den gleichen Resultaten wie die Prüfungen unter SINK-Bedingungen.

Es läßt sich also die Schlußfolgerung ziehen, daß die Einbettung von Liposomen keine Vorteile bietet, wohl aber der Zusatz von Tensiden zu den bisher eingesetzten Kolloideinbettungen. Solche Produkte, bestehend aus Digoxigenin, Sojaphosphatid, Cholesterol und Celluloseether, weisen auch aufgrund ihrer Stabilität günstige Voraussetzungen für die pharmazeutische Anwendung auf.

8. Anhang

8.1. Analysenmethoden

8.1.1. Differential Scanning Calorimetry

Gerät: DSC-Apparatur: Perkin Elmer DSC 2C mit Trockenbox
Analysenbedingungen:
Heizrate : 10 K/min.
Probenbehälter: Aluminium-Pfännchen, kaltverschweißt
Referenz : Aluminium-Pfännchen, kaltverschweißt
Einwaagen : ca. 3 mg

Auswertung:
Datenspeicherung und -ausgabe über Thermal Analysis Data Station, Perkin Elmer

8.1.2. Differentialthermoanalyse

Gerät: DTA-Apparatur: Mettler TA 2000 als Tieftemperaturausführung (98 - 823 K ≙ -175 bis 550 ^{o}C)

Analysenbedingungen:
Heizrate: Wenn nicht anders angegeben 5 K/min.
Meßbereich: 100 µV bei trockenen und bei wäßrigen Proben
Probenbehälter: Aluminium-Tiegel, kaltverschweißt, 40 µl, Deckel perforiert
Referenz: Aluminium-Tiegel, leer, Deckel perforiert
Spülgas: Stickstoff, nachgereinigt, 25 ml/min.
Einwaagen: 2 - 3 mg

Auswertung:
Datenspeicherung und -ausgabe über Calculator HP 9815, Kurvenzeichnung mit Plotter HP 7225A der Fa. Hewlett Packard.

8.1.3. Dünnschichtchromatographie

DC-Platten: DC-Fertigplatten Kieselgel 60 F_{254}
Schichtdicke 0,25 mm, Merck Art.Nr. 5720

Fließmittel für die Dünnschichtchromatographie:

A) Ethylacetat/n-Hexan/Eisessig (80 : 10 : 10)
B) Diethylether/Methanol (90 : 10)
C) Chloroform/Aceton (65 : 35)

Detektion:

1) Fluoreszenzlöschung auf DC-Platten mit Fluoreszenzindikator
2) Ekkert-Reaktion: Violettfärbung der Flecken mit 0,5 % Anisaldehyd in Eisessig/Schwefelsäure (98 : 2) und anschließendem Trocknen bei 373 K (100 °C) für 5 Minuten (81)

8.1.4. Hochdruckflüssigkeitschromatographie

Geräte:
Säule: Hibar Lichrosorb® RP 18, 250 mm x 4 mm i.D., 10 µm
Pumpe: Altex, Modell 110 A
Spektralphotometer: Uvicon 720 LC

Analysenbedingungen:
Fließmittel : Methanol/Wasser (55 : 45)
Flußrate : 2,0 ml/min.
Probenmenge : 50 µl einer Lösung von 1 µg Digoxigenin und 1 µg Phenytoin (innerer Standard) in Methanol/Wasser (1 : 1) drucklos über Rheodyne-Ventil eingespritzt
Detektion : UV-Absorption bei 220 nm

Steuerung und Auswertung:
Minc 11 in Verbindung mit Plotter HP 7225A

8.1.5. Infrarotspektroskopie

Gerät: Grating Infrared Spectrophotometer 457
der Fa. Perkin Elmer

Analysenbedingungen:
Scan Mode : medium und slow
Meßtemperatur : 295 K (22 °C)
Konzentration der Probe: 0,5 % in KBr-Preßling

8.1.6. Polarisationsmikroskopie

Binokulare Forschungsmikroskope der Fa. Hertel und Reuss, Kassel
Superpan S-BIN-RKPO-DZ-POG/B-dpo-4031-7075 und
Superpan S-BIN-RTG-DZ-POG/B-dpo-4031-7075 mit
Mikroskopheiztisch 350 der Fa. Leitz, Wetzlar

8.1.7. Rasterelektronenmikroskopie

Gerät: Siemens Autoscan MP 43
Sputter-Anlage : Fa. E. Leitz, Wetzlar
Glühkathode : Au
Heizstrom : 1,5 mA
Spülgas : Argon
Besputterungsdauer: Pulver ca. 3 - 5 min.
Kammerdruck : 13,3 Pa

8.1.8. Röntgendiffraktometrie

Gerät: Röntgenpulverdiffraktometer, Fa. Philips, Kassel, mit
Röntgengenerator PW 1730, Vertikalgoniometer PW 1050

Schrittmotor und Steuereinheit PW 1394
Proportionalzählrohr PW 1965/60, Verstärkereinheit PW 1390 mit Impulshöhendiskriminator, Recorder PM 8203, Röntgenröhre PW 2233/20, Focus N, Anodenmaterial - Kupfer, Cu-K_α- Strahlung λ = 1,5418 Å

Sonderzubehör:
TTK-Röntgen-Vakuumkamera für mittlere und tiefere Temperaturen, Kat.Nr. 25100
TTK-Heizregler, Kat.Nr. 25110
Hersteller: Fa. A. Paar KG, A-Graz

Analysenbedingungen:

Anodenspannung	: 40 kV
Heizstrom	: 30 mA
Winkelgeschwindigkeit	: 0,05° 2Θ/s (step)
Filter	: Nickel im Primärstrahl
Aperturblende	: 1°
Zählrohrblende	: 1°, 0,2 mm

Auswertung:
Mit Calculator HP 9815A in Verbindung mit Plotter HP 7225A bzw. Minc 11 der Fa. Digital Equipment + Plotter HP 7225A.

8.1.9. Thermogravimetrie

Gerät: Mettler-Thermoanalysenwaage HE 20,
Steuergerät BE 20

Analysenbedingungen:

Einwaage	: ca. 50 mg
Heizrate	: 5 K/min
Meßbereich BE 20	: 0,1 g
Spülgas	: Stickstoff (nachgereinigt) beim Aufheizen (70 ml/min.) Luft beim Abkühlen (70 ml/min.)

Aufzeichnung:
x-y-Schreiber Omnigraphic 2000 (Houston, Texas)
Meßbereich x-Achse : 0,05 - 0,1 mV/cm
Meßbereich y-Achse : 5 mV/cm ≙ 0,5 mg/cm

8.2. Verwendete Geräte

Magnetrührer:
IKA-Combimag

Mühle:
RETSCH-Mörsermühle: Mikroschnellmühle Type MS,
Achat-Mahlgarnitur 8 ml bzw. 0,5 ml

Rotationsverdampfer:
Heidolph mit Verdampferantrieb VV 1,
Glassatz V1 und Heizbad

Schlauchpumpe:
Desaga PLG-Vielfach-Schlauchpumpe Typ 13 21 00

Schüttelgerät:
Heidolph REAX

Spektralphotometer:
Beckman Instruments, Modell 24, mit UV-Zusatzausrüstung,
Sipper System und Schreiber

Zentrifuge:
Heraeus, Typ 8590, mit Steuergerät

Zerstäubungstrockner:
BOCHI 190, Mini Spray Dryer, mit Zweistoffdüse
Gastaldi FSM, Mini-Spray HO mit Dreistoffdüse.

8.3. Verwendete Materialien

Aceton	E. Merck, Darmstadt, Art.-Nr. 13
Acetonitril	E. Merck, Darmstadt, Art.-Nr. 15500
Anisaldehyd	E. Merck, Darmstadt, Art.-Nr. 822314
Calciumchlorid-Dihydrat	E. Merck, Darmstadt, Art.-Nr. 2382
Calciumchlorid-Hexahydrat	E. Merck, Darmstadt, Art.-Nr. 2072
Calciumnitrat-Tetrahydrat	E. Merck, Darmstadt, Art.-Nr. 2121
Chloroform	E. Merck, Darmstadt, Art.-Nr. 2431
Cholesterol	E. Merck, Darmstadt, Art.-Nr. 3672
Diethylether	Hoechst AG, Frankfurt/Main
Digoxigenin	Fluka AG, Buchs SG, Art.-Nr. 37090
Digoxigenin	E. Merck, Darmstadt
Digoxin	E. Merck, Darmstadt, Art.-Nr. 3047
Digoxin CRS	Techn. Sekretariat der Arzneibuchkommission, Straßburg
Dimethylformamid	E. Merck, Darmstadt, Art.-Nr. 3053
Eisessig	E. Merck, Darmstadt, Art.-Nr. 63E
Ethanol	E. Merck, Darmstadt, Art.-Nr. 971
Ethylacetat	E. Merck, Darmstadt, Art.-Nr. 9623
n-Hexan	E. Merck, Darmstadt, Art.-Nr. 4391
Hydroxypropylmethylcellulose Methocel E5, E15	DOW Chemical GmbH, Stade-Brunshausen
Isopropanol	E. Merck, Darmstadt, Art.-Nr. 9634
Kaliumbromid	E. Merck, Darmstadt, Art.-Nr. 4907
Methanol	E. Merck, Darmstadt, Art.-Nr. 6009
Methylcellulose, Methocel A15	DOW Chemical GmbH, Stade-Brunshausen
Natriumcarbonat-Dekahydrat	E. Merck, Darmstadt, Art.-Nr. 6384
Natriumchlorid	E. Merck, Darmstadt, Art.-Nr. 6404
Phenytoin	E. Merck, Darmstadt, Art.-Nr. 820534
Polyvinylpyrrolidon Kollidon 17 bzw. 25	BASF, Ludwigshafen
Salzsäure	E. Merck, Darmstadt, Art.-Nr. 316
Schwefelsäure	E. Merck, Darmstadt, Art.-Nr. 731
Silikonöl AK 500	Wacker-Chemie GmbH, Burghausen/Obb.
Sojaphosphatid NC 95 und NC 95 H	Nattermann Chemie GmbH, Köln
Stickstoff, nachgereinigt	Linde AG, Nürnberg.

9. Literaturverzeichnis

1) Nürnberg E., Dölle B.,
APT 29, 1 (1983)

2) Nürnberg E., Dölle B.,
APT 29, 75 (1983)

3) Müller J., Eckert T.,
Pharmazie 35, 471 (1980)

4) Black D.B., Lovering E.G.,
J. Pharm. Pharmac. 29, 684 (1977)

5) Florence A.T., Salole E.G., Stenlake J.B.,
J. Pharm. Pharmac. 26, 479 (1974)

6) Black D.B., Lovering E.G.,
J. Pharm. Pharmac. 30, 380 (1978)

7) Nürnberg E., Werthmann A.,
Pharm. Ind. 40, 1061 (1978)

8) Yeh G.S.Y., Geil P.H.,
J. Macromol. Sci. 8, 251 (1967)

9) Frank W., Goddar H., Stuart H.A.,
Polym. Lett. 5, 711 (1967)

10) Bonart R.,
Kolloid Z. 213, 1 (1966)

11) Hoffmann M., Krömer H., Kuhn R.,
Polymeranalytik I, Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1977)

12) Loboda-Cackovic R., Hosemann R., Cackovic H.,
J. Mater. Sci. 6, 269 (1971)

13) Fuller C.S., Baker W.O.,
J. Am. Chem. Soc. 65, 1120 (1943)

14) Kuhnert-Brandstätter M.,
Pharm. UZ 4, 131 (1975)

15) Kuhnert-Brandstätter M.,
Pharm. Ind. 39, 377 (1977)

16) Kuhnert-Brandstätter M., Gasser P.,
Microchim. J. 16, 419 (1971)

17) Kuhnert-Brandstätter M., Gasser P.,
Microchim. J. 16, 577 (1971)

18) Kuhnert-Brandstätter M., Grimm H.,
Mikrochim. Acta 1968, 115

19) Kuhnert-Brandstätter M., Grimm H.,
Mikrochim. Acta 1968, 127

20) Seiller E.,
Dissertation, Erlangen 1984

21) Dölle B.,
Dissertation, Erlangen 1981

22) Burger A.,
Kurzreferat im Programmheft zum 24. Jahrestag der
APV, Forum Technologicum 1978

23) Anderson C.M.,
Australasian J. Pharm. 47, S44 (1966)

24) Aguiar A.J., Krc J., Kinkel A.W., Samyn J.C.,
J. Pharm. Sci. 56, 847 (1967)

25) Aguiar A.J.,
J. Pharm. Sci. 58, 963 (1969)

26) Aguiar A.J., Zelmer J.,
J. Pharm. Sci. 58, 983 (1969)

27) Borka L.,
Acta Pharm. Suecica 7, 1 (1970)

28) Borka L.,
Acta Pharm. Suecica 8, 365 (1971)

29) Gault M.H., Charles J.D., Sugden D.L., Kepkay D.C.,
J. Pharm. Pharmac. 29, 27 (1977)

30) Sternson L.A., Shaffer R.D.,
J. Pharm. Sci. 67, 327 (1978)

31) Kuhlmann J., Abshagen U., Rietbrok N.,
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 276, 149 (1973)

32) Khalil S.A.H., El-Masry S.,
J. Pharm. Sci. 67, 1358 (1978)

33) Gault H., Kalra J., Ahmed M., Kepkay D., Barrowman J.,
Clin. Pharmacol. Ther. 27, 16 (1980)

34) Gault H., Kalra J., Ahmed M., Kepkay D., Longerich L.,
Barrowman J.,
Clin. Pharmacol. Ther. 29, 181 (1981)

35) Beermann D., Hellström K., Rosén A.,
Clinical Science 43, 507 (1972)

36) Kroneberg G.,
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. 237,
222 (1959)

37) Marcus F.I., Ryan J.N., Stafford M.G.,
J. Lab. Clin. Med. 85, 865 (1966)

38) Gault M.H., Sugden D., Maloney C., Ahmed M., Tweeddale M.,
Clin. Pharmacol. Ther. 25, 499 (1979)

39) Brown, Abraham,
J. Lab. Clin. Med. 82, 201 (1973)

40) Kuhlmann J.,
DAZ 121, 2281 (1981)

41) Repke K.,
Experientia 19, 452 (1963)

42) Repke K.,
Planta Med. 20, 66 (1971)

43) Hull S.M., Mackintosh A.,
Lancet II, 1054 (1977)

44) Hurwitz N., Wade O.L.,
Br. Med. J. I, 531 (1969)

45) Flasch H., Heinz N.,
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 304, 37 (1978)

46) Yoda,
Molecular Pharmacology 12, 399 (1976)

47) Nürnberg E.,
Pharm. Ind. 38, 74 (1976)

48) Nürnberg E.,
Pharm. Ind. 38, 228 (1976)

49) Nürnberg E., Graf E.,
Pharm. UZ 3, 1 (1974)

50) Nürnberg E.,
Progr. Colloid & Polymer Sci. 59, 55 (1976)

51) Estler C.-J.,
Lehrbuch der allgemeinen und systematischen Pharmakologie und Toxikologie, Schattauer-Verlag, Stuttgart, New-York (1983)

52) Auterhoff H.,
Lehrbuch der Pharmazeutischen Chemie, Wiss. Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart (1976)

53) Beyer H., Walter W.,
Lehrbuch der organischen Chemie, S. Hirzel Verlag, Stuttgart (1981)

54) Greeff K.,
Cardiac Glycosides Part I, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1981)

55) Mutschler E.,
Arzneimittelwirkungen, Wiss. Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart (1976)

56) Forth W., Henschler D., Rummel W.,
Pharmakologie und Toxikologie, Bibliographisches Institut, Mannheim, Wien, Zürich (1980)

57) Europäisches Arzneibuch,
Band I-III, Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart, GOVI-Verlag GmbH, Frankfurt (1975)

58) British Pharmacopeia 1980,
University Press, Cambridge

59) The United States Pharmacopeia,
21st Revision, Mack Printing Company, Easton, Pa. (1985)

60) Beilsteinsches Handbuch der Organischen Chemie,
Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1975)

61) The Merck Index,
Merck & Co. Inc., Rahway N.J. (1976)

62) Smith S.,
J. Chem. Soc. 1930, 508

63) Burger A.,
APT 28, 1 (1982)

64) Katalog 14 der FLUKA AG, Buchs (1984)

65) Stahl E., Kaltenbach U.,
J. Chromatog. 5, 458 (1961)

66) Szeleczky Z.,
J. Chromatog. 178, 453 (1979)

67) Clarke C.J., Cobb P.H.,
J. Chromatog. 168, 541 (1979)

68) Carvalhas M.L., Figueira M.A.,
J. Chromatog. 86, 254 (1973)

69) Züllich G., Braun W., Lisboa B.P.,
J. Chromatog. 103, 396 (1975)

70) Nachtmann F., Spitzy H., Frei R.W.,
J. Chromatog. 122, 293 (1976)

71) Nelson H.A., Lucas S.V., Gibson T.P.,
J. Chromatog. 163, 169 (1979)

72) Rehm K.D., Steinigen M.,
Ph. Ztg. 126, 99 (1981)

73) Fujii Y., Fukuda H., Saito Y., Yamazaki M.,
J. Chromatog. 202, 139 (1980)

74) Desta B., Mc Erlane K.M.,
J. Pharm. Sci. 71, 1018 (1982)

75) Desta B., Mc Erlane K.M.,
J. Pharm. Sci. 71, 777 (1982)

76) Meyer V.,
Praxis der Hochdruckflüssigkeitschromatographie, Diesterweg/Salle, Frankfurt/Main, Berlin, München (1979)

77) Engelhardt H.,
Hochdruckflüssigkeitschromatographie, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1977)

78) Hentze G., Voege H.,
Pharm. Ind. 33, 519 (1971)

79) Schultze D.,
Differentialthermoanalyse, Verlag Chemie GmbH, Weinheim/Bergstr. (1969)

80) Stahl E.,
Dünnschichtchromatographie, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1967)

81) Randerath K.,
Dünnschichtchromatographie, Verlag Chemie GmbH, Weinheim/Bergstr. (1975)

82) Kofler L.,
Thermomikromethoden, Univ. Verlag Wagner, Innsbruck (1954)

83) Muckenschnabel R.,
Dissertation, Erlangen 1983

84) Gebler H.,
Tabellen für die pharmazeutische Praxis, GOVI-Verlag GmbH, Frankfurt/Main (1982)

85) Kneule F.,
Das Trocknen, Sauerländer AG, Aarau (1975)

86) Bragg W.L.,
Proc. Cambridge Phil. Soc. 17, 43 (1913)

87) Krischner H.,
Einführung in die Röntgen-Feinstrukturanalyse, Vieweg Verlagsgesellschaft, Braunschweig (1980)

88) Klug H.P., Alexander L.E.,
X-Ray Diffraction Procedures, John Wiley & Sons,
New York, London (1974)

89) Kuhnert-Brandstätter M., Ulmer R.,
Arch. Pharm. 306, 618 (1973)

90) Burger A.,
Sci. Pharm. 44, 107 (1976)

91) Bellamy L.J.,
Ultrarot-Spektrum und chemische Konstitution, Dr.
Dietrich Steinkopff Verlag, Darmstadt (1966)

92) Haleblian J., Koda R., Biles J.,
J. Pharm. Sci. 60 1485 (1971)

93) Moustafa M., Ebian A., Khalil S., Motawi M.,
J. Pharm. Pharmacol. 23, 868 (1971)

94) Nürnberg E.,
Pharm. Ztg. 114, 128 (1969)

95) Kohl P.,
Dissertation, Erlangen 1979

96) Hopp A.,
Dissertation, Erlangen 1981

97) Nürnberg E.,
Habilitationsschrift, Marburg 1970

98) Junginger H.,
Pharm. Ind. 39, 822 (1977)

99) Sucker H., Fuchs P., Speiser P.,
Pharmazeutische Technologie, Georg Thieme Verlag,
Stuttgart (1978)

100) Junginger H.,
Habilitationsschrift, Braunschweig 1976

101) Kala H., Traue J., Moldenhauer H., Zessin G.,
Pharmazie 34, 779 (1979)

102) Kals H., Traue J., Moldenhauer H., Zessing G.,
Pharmazie 36, 106 (1981)

103) Krieger M.,
Dissertation, Erlangen 1980

104) Müller B.W., Bear Y.,
APT 28, 97 (1982)

105) Atkinson R.M., Bedford C., Child K.J., Towich E.G.,
Nature 193, 588 (1962)

106) Shaw T.R.D., Carless J.E., Howard M.R., Raymond K.,
Lancet 2, 209 (1973)

107) Junginger H.,
DAZ 116, 1880 (1976)

108) Sigrist K., Heinicke G., Steiner U.,
Krist. Tech. 8, 393 (1973)

109) Schrader R., Hoffmann B.,
Z. Anorg. Allg. Chem. (369), 41 (1969)

110) Schrader R., Weigelt O.,
Z. Anorg. Allg. Chem. (372), 228 (1970)

111) Haleblian J., McCrone W.,
J. Pharm. Sci. 58, 911 (1969)

112) Mitscherlich E.,
Ann. chim. phys. 19, 350 (1821)

113) Wöhler F., Liebig J.,
Ann. Pharm. 3, 249 (1832)

114) Thron T.M.,
Dissertation, Marburg 1979

115) Brandstätter-Kuhnert M.,
Österreichische Apotheker-Zeitung 13, 297 (1959)

116) Hagers Handbuch der Pharm. Praxis,
Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1967)

117) Römpps Chemie Lexikon,
Franck'sche Verlagshandlung, Stuttgart (1979)

118) Handbook of Chemistry and Physics,
CRC Press, 60th edition 1979 - 1980

119) Almirante L., De Carneiri I., Coppi G.,
Farmaco Ed. Prst. 15, 471 (1960)

120) Maruyama M., Hayashi N., Kishi M.,
Takamine Kenkyusho Nempo 13, 176 (1961)

121) Higuchi W.J., Lau P.K., Higuchi T., Shell J.W.,
J. Pharm. Sci. 52, 150 (1963)

122) Ballard B.E., Nelson E.J.,
J. Pharmacol. exp. Therap. 135, 120 (1962)

123) Higuchi W.J., Bernardo P.D., Mehta S.C.,
J. Pharm. Sci. 56, 200 (1967)

124) Nogami H., Nagai T., Fukuoka F., Yotsuyanagi T.,
Chem. Pharm. Bull. 10, 1161 (1962)

125) Milosovich G.,
J. Pharm. Sci. 53, 484 (1964)

126) Kuhnert-Brandstätter M., Martinek A.,
Mikrochim. Acta 1965, 909

127) Kuhnert-Brandstätter M., Burger A.,
Pharm. Ind. 34, 187 (1972)

128) Chattaway F.D.,
J. Chem. Soc. 107, 1773 (1915)

129) Kofler L.,
Mikrochim. Acta 1960, 904

130) Nürnberg E., Buhl-Wiederholt A., Schenk D.,
Pharm. Ind. 38, 907 (1976)

131) Nürnberg E., Dölle B.,
Pharm. Ind. 42, 1019 (1980)

132) Nernst W.,
Z. physik. Chem. 47, 52 (1904)

133) Brunner E.,
Z. physik. Chem. 47, 56 (1904)

134) Noyes A.A., Whitney W.R.,
J. Amer. Chem. Soc. 19, 930 (1897)

135) Noyes A.A., Whitney W.R.,
Z. physik. Chem. 23, 689 (1897)

136) Kuhnert-Brandstätter M.,
Pharm. Ind. 34, 353 (1972)

137) Niebergall P.J., Goyan J.E.,
J. Pharm. Sci. 52, 29 (1963)

138) Burger A.,
Sci. Pharm. 45, 269 (1977)

139) Bawart O.,
Dissertation, Innsbruck 1974

140) Burger A., Ramberger R.,
Mikrochim. Acta 1979 II, 273

141) Burger A.,
Pharm. UZ 11, 177 (1982)

142) Kutz G.,
Dissertation in Vorbereitung, Erlangen

169) EP 0 162 724.A2,A61K 9/50, 24.5.85,
VESTAR RESEARCH INC., Pasadena Calif. (US)

170) EP 0 140 058 A2,A61K 9/50, 11.9.84,
Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd., Osaka (JP)

171) DOS DE 3412793 A1,A61K 39/35, 5.4.84,
Basotherm GmbH, Biberach (DE)

172) J 591 37409-A,A61K 09/10, A61K 31/55, 27.1.83,
Green Cross Corp. (JP)

173) J 57179114, A61K 09, 25.4.81,
Green Cross Corp. (JP)

174) DT-2249352-Q, A61K 09/04, 22.10.71,
Inchema SA. (CH)

175) Arrieta-Molero J.F., Aleck K., Sinha M.K.,
Horm. Res. 16, 249 (1982)

176) Kawada J., Tanaka N., Nozaki Y.,
Endocrinol. Jpn. 28, 235 (1981)

177) Fountain M.W., Ganjan V.K., Ravis W.R., Pedersoli W.D.,
Drug Chem. Toxicol. 4, 353 (1981)

178) Fountain M.W., Pedersoli W.D., Ravis W.R., Ganjan V.K.,
Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 8, 287 (1981)

179) Asmussen B., Heinz N.,
Arzneim. Forsch./Drug Res. 30, 2168 (1980)

180) Nyberg L.,
Acta Pharmacol. Toxicol. 40, Suppl. III, 1 (1977)

181) Lippold B.C.,
Biopharmazie, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft
mbH, Stuttgart (1984)

182) Nürnberg E.,
APT 26, 39 (1980)

183) Nürnberg E.,
Acta Pharmaceutica Hungarica 48, 19 (1978)

184) Kuhnert-Brandstätter M., Junger E., Kofler A.,
Mikrochemical Journal 9, 105 (1965)

185) Haleblian J.K.,
J. Pharm. Sci. 64, 1269 (1975)

186) Kuhnert-Brandstätter M.,
Informationsdienst APV 19, 73 (1973)

187) Lix H., Gensch K.-H., Schenck G.,
DAZ 111, 1490 (1971)

188) Junginger H., Führer C.,
DAZ 116, 1273 (1976)

189) Junginger H.,
Pharm. Ind. 39, 68 (1977)

190) Kuhnert-Brandstätter M.,
Thermomicroscopy in the Analysis of Pharmaceuticals,
Pergamon-Press, Oxford (1971)

191) Attwood D., Florence A.T.,
Surfactant Systems, Chapman & Hall, London, New York
(1985)

192) Friberg S.,
Food Emulsions, Marcel Dekker Inc., New York, Basel
(1976)

193) Schuster G.,
Emulgatoren für Lebensmittel, Springer-Verlag, Berlin,
Heidelberg, New York, Tokyo (1985)

194) Weinstein J.N.,
Pure & Appl. Chem. 53, 2241 (1981)

195) Gregoriadis G.,
The New England Journal of Medicine 295, 704 (1976)

196) Gregoriadis G.,
The New England Journal of Medicine 295, 765 (1976)

197) Ghosh P., Bachhawat B.K.,
Journal of Scientific and Industrial Research 39,
689 (1980)

198) Axt J., Sarrach D., Zipper J.,
Pharmazie 38, 247 (1983)

199) El Aresh K., Olliff C.J., Phillips A.J., Marriott C.,
J. Pharm. Pharmacol. 36, 74 (1984).

Lebenslauf

Name:	Hans-Ulrich Hartmut Heller
10.07.1956	geboren in Nürnberg als erstes Kind der Eheleute Ehrenfried Heller, Diplomingenieur, und Hedwig Heller, geb. Oetterer, Studienrätin
1962 - 1966	Besuch der Prinzregent-Luitpold-Schule in Erlangen
1966 - 1975	Besuch des humanistischen Gymnasiums, Gymnasium Friedericianum, in Erlangen
21.06.1975	Reifeprüfung
WS 1975/76	Studium der Pharmazie an der Julius-Maximilians-Universität in Würzburg
SS 1976	Studium der Zahnmedizin an der Friedrich-Alexander-Universität in Erlangen
WS 1976/77 - SS 1980	Studium der Pharmazie an der Friedrich-Alexander-Universität in Erlangen
20.09.1978	1. Prüfungsabschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
15.12.1980	2. Prüfungsabschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
15.11.1980 - 31.05.1981	Praktikum in der Föhren-Apotheke in Erlangen
ab 01.06.1981	Doktorand bei Herrn Prof. Dr. E. Nürnberg am Lehrstuhl für Pharmazeutische Technologie, Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie
09.12.1981	3. Prüfungsabschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
21.12.1981	Approbation als Apotheker
ab 16.10.1983	Verwalter der Dienstgeschäfte eines wissenschaftlichen Assistenten auf Zeit
06.06.1986	Erlaubnis zur Ausübung der Heilkunde ohne Bestallung.

Die Wissenschaft fängt eigentlich erst da an interessant zu werden, wo sie aufhört.

(Justus von Liebig, Chemische Briefe 1844,1847)